

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Abteilung Medizinische Zellbiologie
Direktor: Prof. Dr. Ralf Kinscherf
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Der Effekt von chronisch-intermittierender Hypoxie auf
myokardiale Vaskularisation, Entzündung und
mitochondriale Integrität im Mausmodell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Franziska Büttner aus Friedrichroda

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 03.08.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. R. Kinscherf

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. S. Vogt

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Syndrom der obstruktiven Schlafapnoe (OSAS)	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie	1
1.1.2	Diagnosestellung und klinisches Erscheinungsbild	3
1.1.3	Pathophysiologie	5
1.1.4	Risikofaktoren	6
1.1.5	Therapie	8
1.2	OSAS als kardiovaskulärer Risikofaktor	10
1.2.1	Mechanismen	10
1.2.2	OSAS und arterielle Hypertonie	12
1.2.3	Koronare Herzerkrankung und Schlaganfälle	13
1.2.4	Diabetes	14
1.2.5	Effekt der CPAP-Therapie	14
1.3	OSAS und die Auswirkungen auf das Herz	16
1.3.1	Kapillarisation des Myokards	16
1.3.2	Kardiales Remodeling	19
1.3.3	Herzinsuffizienz	24
1.4	Ziel der Arbeit	29
2	Material und Methoden	31
2.1	Material	31
2.1.1	Geräte	31
2.1.2	Chemikalien	32
2.1.3	Materialien	35
2.1.4	Antikörper	36
2.1.5	Primer	37
2.1.6	Kits	38
2.1.7	Anwendungen/Software	39
2.2	Methoden	40
2.2.1	Das Maus-Modell der chronisch-intermittierenden Hypoxie	40
2.2.2	Materialgewinnung und Materialvorbereitung	41

2.2.3	Färbungen	42
2.2.4	Molekularbiologische Analyse der Herzmuskelbiopsien mittels qRT-PCR	46
2.2.5	Transmissionselektronenmikroskopie	49
3	Ergebnisse	56
3.1	Auswirkungen von CIH auf Kapillarisation und Angiogenese-Marker.....	56
3.1.1	Histochemische Untersuchung der Kapillardichte.....	56
3.1.2	Molekularbiologische Untersuchung der angiogenetischen Marker	58
3.2	Auswirkungen von CIH auf das Inflammationsniveau	59
3.2.1	Immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchung von COX-2	59
3.2.2	Immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchung von TNF- α	61
3.2.3	Immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchung von IL-1 β ...	63
3.2.4	Molekularbiologische Untersuchung von IL-6	65
3.3	Molekularbiologische Untersuchung von PMCA4a/b und PMCA4b.....	66
3.4	Molekularbiologische Untersuchung von SOCS3.....	67
3.5	Molekularbiologische Untersuchung der Apoptosemarker	68
3.6	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Mitochondrien.....	69
3.6.1	Anzahl der Mitochondrien pro Fläche.....	69
3.6.2	Anteil der Mitochondrien an der Gesamtfläche	71
3.6.3	Durchschnittliche Mitochondriengröße	72
3.6.4	Integrität der Mitochondrien.....	73
4	Diskussion.....	74
4.1	Das Mausmodell der CIH.....	74
4.2	Auswirkungen von CIH auf myokardiale Angiogenese	75
4.3	Auswirkungen von CIH auf die ventrikuläre Funktion	79
4.4	Auswirkungen von CIH auf kardiale Fibrosierung und Hypertrophie	83
5	Zusammenfassung	98
6	Summary	100
7	Abkürzungsverzeichnis.....	101
8	Tabellenverzeichnis.....	106

9	Bildverzeichnis	107
10	Literaturverzeichnis.....	109
11	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	138
12	Danksagung	139

1 Einleitung

1.1 Das Syndrom der obstruktiven Schlafapnoe (OSAS)

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Das Syndrom der obstruktiven Schlafapnoe (OSAS) ist eine schlafbezogene Atemstörung, welche erstmalig im Jahre 1976 beschrieben wurde (Guilleminault et al. 1976) und angesichts der hohen Prävalenz zunehmend an Bedeutung gewonnen hat. Während Young et al. im Jahre 1993 davon ausgingen, dass ca. 2% der Frauen und 4% der Männer im Alter von 30 bis 60 Jahren von der Störung betroffen sind (Young et al. 1993), konnte in jüngeren Studien eine Prävalenz von 7,5-10% detektiert werden (Young et al. 2002; Plywaczewski et al. 2008). Es handelt sich folglich um die häufigste schlafbezogene Atemstörung (Sankri-Tarbichi 2012), deren Prävalenz sich parallel zur steigenden Inzidenz von Adipositas erhöht (Banno et al. 2005).

Neben dem OSAS werden zu den schlafbezogenen Atemstörungen noch das weitaus seltenere Syndrom der zentralen Schlafapnoe (CSAS) sowie schlafbezogene Hypoventilation und hypoxämische Syndrome gezählt. Die Einteilung erfolgt durch die American Academy of Sleep Medicine (AASM), welche von Duchna 2006 in Anlehnung an die zweite Version der International Classification of Sleep Disorders aus dem Jahre 2005 ins Deutsche übertragen wurde und in Tabelle 1 dargestellt ist (Duchna 2006; American Academy of Sleep Medicine 2014).

Schlafbezogene Atmungsstörungen (ICSD-2)

Zentrale Schlafapnoe-Syndrome

- 1) primäre zentrale Schlafapnoe
- 2) zentrale Schlafapnoe mit Cheyne Stokes Atmungsmuster
- 3) zentrale Schlafapnoe bei Höhengaufenthalt
- 4) zentrale Schlafapnoe bei internistischen/neurologischen Erkrankungen
- 5) zentrale Schlafapnoe bei Drogen- oder Medikamentengebrauch
- 6) primäre Schlafapnoe in der frühen Kindheit

Obstruktive Schlafapnoe-Syndrome <ol style="list-style-type: none"> 1) obstruktive Schlafapnoe, Erwachsene 2) obstruktive Schlafapnoe, Pädiatrie
Schlafbezogene Hypoventilation/hypoxämische Syndrome <ol style="list-style-type: none"> 1) schlafbezogene nicht-obstruktive alveoläre Hypoventilation, idiopathisch 2) kongenitales zentrales alveoläres Hypoventilations-Syndrom
Schlafbezogene Hypoventilation/Hypoxämie bei internistischen/neurologischen Erkrankungen <ol style="list-style-type: none"> 1) schlafbezogene Hypoventilation/Hypoxämie bei Lungenparenchym- oder Gefäßerkrankungen 2) schlafbezogene Hypoventilation/Hypoxämie bei obstruktiver Atemwegserkrankung 3) schlafbezogene Hypoventilation/Hypoxämie bei neuromuskulären Erkrankungen oder Thoraxerkrankungen
Andere schlafbezogene Atmungsstörungen <ol style="list-style-type: none"> 1) Schlafapnoe/schlafbezogene Atmungsstörung, unklassifiziert

Tabelle 1: Übersicht schlafbezogener Atmungsstörungen

In Anlehnung an die Internationale Klassifikation der Schlafstörungen der AASM 2005 (Duchna 2006; American Academy of Sleep Medicine 2014)

Den Schlafapnoe-Syndromen gemeinsam sind die für sie charakteristischen, im Schlaf auftretenden Atemstillstände (Apnoen). Während beim CSAS eine zentralnervöse Störung auf Chemorezeptor- und Neuronenebene mit Ausbleiben des Atemantriebes angenommen wird (De Backer 1995), ist die Pathologie beim OSAS in einer Verengung der oberen Atemwege begründet, sodass es aufgrund eines verminderten Muskeltonus der Rachenmuskulatur während des Schlafes zu einem partiellen (Hypopnoe) oder vollständigen Kollaps (Apnoe) der Atemwege kommen kann (Banno und Kryger 2007). In der Folge reduziert sich der Atemfluss definitionsgemäß für mindestens 10 Sekunden um 30 – 50% (Hypopnoe) bzw. um bis zu 90% (Apnoe), was mit einem signifikanten Abfall (>3%) der Sauerstoffsättigung einhergeht. In Einzelfällen kann dieser Zustand des Atemaussetzens bis zu einer Minute oder darüber hinaus anhalten. Die mit dem Apnoe-Intervall zunehmende Hypoxie führt letztendlich zu einer Weckreaktion (Arousal), durch welche die Apnoe-Hypopnoe-Episode beendet wird (Duchna 2006; Patil et al. 2007).

Die Anzahl der Apnoen und Hypopnoen pro Stunde Schlaf wird als Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) bezeichnet und sowohl zur Diagnosestellung als auch zur

Schweregradeinteilung herangezogen (Duchna 2006). Ein AHI ≥ 5 gilt als pathologisch; man spricht von einer schlafbezogenen Atemstörung. Nach dieser Definition (AHI ≥ 5) sind 9% der Frauen und 24% der Männer mittleren Alters von einer schlafbezogenen Atemstörung betroffen (Young et al. 1993). Die Diagnose des OSAS darf gestellt werden, wenn die Patienten zusätzlich zum pathologischen AHI von typischer Symptomatik wie Tagesmüdigkeit, Schnarchen u. ä. berichten (Young et al. 1993; Duchna 2006).

1.1.2 Diagnosestellung und klinisches Erscheinungsbild

Wie im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, wird zur Diagnosestellung der AHI herangezogen, welcher in einem Schlaflabor mit der Polysomnographie erfasst werden kann. Anhand der Anzahl der Apnoe-Hypopnoe-Phasen pro Stunde lässt sich der Schweregrad des OSAS in mild (5-15 Apnoe-Hypopnoe-Episoden/h), mittelgradig (15-30 Apnoe-Hypopnoe-Episoden/h) und schwer (>30 Apnoe-Hypopnoe-Episoden/h) einteilen (Duchna 2006). Die Polysomnographie, welche als Goldstandard zur Untersuchung und Diagnosestellung gilt, ermöglicht die nächtliche Überwachung von Hirnströmen (Elektroenzephalographie, EEG), Augenbewegungen (Elektrookulographie, EOG), Elektrokardiographie (EKG), Herzfrequenz, Sauerstoffsättigung, Thorax- und Abdomenbewegungen, Elektromyogramm (EMG) des Kinns und nasalem Atemfluss in einem Schlaflabor (Banno und Kryger 2007). Zusätzlich werden die Patienten bezüglich ihrer Symptomatik befragt, wobei eine ausgeprägte Tagesmüdigkeit bzw. nächtliches Schnarchen das Beschwerdebild dominieren. Die AASM definiert das OSAS in der International Classification of Sleep Disorders wie in folgender Abbildung beschrieben:

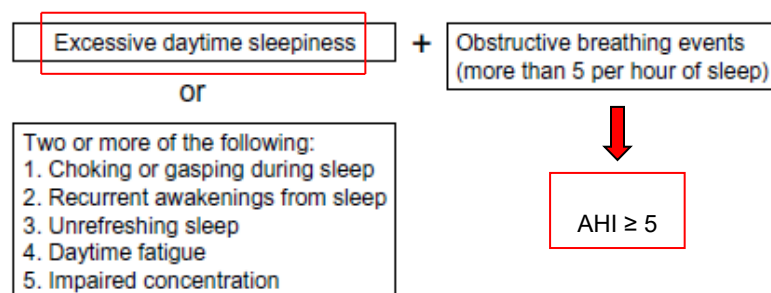


Abbildung 1: Diagnosekriterien des OSAS

Zur Diagnosestellung müssen mindestens ein AHI ≥ 5 sowie OSAS-typische Symptome vorliegen (Banno und Kryger 2007, modifiziert).

Neben einem AHI ≥ 5 müssen die Patienten OSAS-typische Symptomatik zeigen. Dazu gehören neben der bereits erwähnten ausgeprägten Tagesschläfrigkeit mit

Einschlafneigung, von welcher nahezu die Hälfte aller Patienten mit mittelgradigem und schwerem OSAS betroffen sind und die mit einer erhöhten Gefahr für Autounfälle einhergeht (Teran-Santos et al. 1999), auch Schlafstörungen infolge der wiederholten nächtlichen Weckreaktionen (Kapur et al. 2005). Nicht immer nehmen die Patienten diese Arousals subjektiv wahr; häufig berichten nur ihre Partner von lautem Schnarchen und Atempausen, die durch ein Schnappen nach Luft beendet werden (Young et al. 1993; Banno und Kryger 2007). In einer Studie von Ohayon et al. gaben 40% der Befragten an, Schnarcher zu sein, wobei dies signifikant mit dem männlichen Geschlecht, Alter über 25 Jahren, Adipositas, Tageschläfrigkeit und Nikotinkonsum vergesellschaftet war. Über Atempausen berichteten 3,8% der Teilnehmer, wobei auch hier häufiger ältere Männer betroffen waren (Ohayon et al. 1997). Die entstehende Schlafragmentierung infolge der wiederholten Weckreaktionen führt dazu, dass sich die Patienten trotz ausreichender Schlafdauer nicht erholt fühlen, mit morgendlichen Kopfschmerzen aufwachen oder gar depressiv verstimmt sind (Banno und Kryger 2007). Des Weiteren führen die hypoxischen Zustände während der Apnoen und Hypopnoeen zu einer Volumenminderung der grauen Substanz in bestimmten Arealen des Großhirns, wovon vor allem der Hippocampus, der linke parietale und der rechte frontale Kortex betroffen sind. Störungen der kognitiven Funktionen sind die Folge. Dies äußert sich bei den Patienten in einer Beeinträchtigung des Kurz- und Langzeitgedächtnisses, der Konzentrationsfähigkeit und Vigilanz sowie des Denkvermögens, was zu Einschränkungen im Alltag der Betroffenen führt und mit einer reduzierten Lebensqualität einhergeht (Canessa et al. 2011).

1.1.3 Pathophysiologie

Beim OSAS kommt es zu einer Verengung bzw. zu einem Verschluss der oberen Atemwege, wodurch sich der Atemfluss reduziert. Je nachdem, welches Ausmaß diese Obstruktion annimmt, spricht man von einer Hypopnoe (30–50%ige Reduktion des Atemflusses) oder von einer Apnoe (bis 90%ige Reduktion des Atemflusses) (Somers et al. 2008). Abbildung 2 verdeutlicht dies.

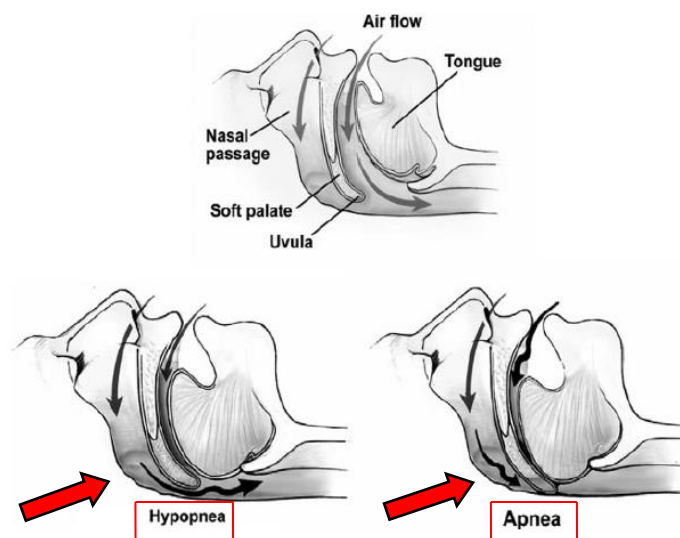


Abbildung 2: Partielle und vollständige Obstruktion der oberen Atemwege bei OSAS
(Somers et al. 2008, modifiziert)

Der Zustand des reduzierten Atemflusses kann bis zu einer Minute und darüber hinaus anhalten, sodass es in dieser Zeit zu einer inadäquaten alveolären Ventilation mit unzureichender Sauerstoffversorgung kommt. Die Sauerstoffsättigung (SpO_2) und der arterielle Sauerstoffpartialdruck (p_aO_2) fallen ab (Hypoxie), der Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO_2) steigt an (Hyperkapnie). Diese Veränderungen werden von peripheren Chemorezeptoren im Aortenbogen und Glomus caroticum an der Teilungsstelle der Arteria carotis communis und von zentralen Chemorezeptoren im Atemzentrum der Medulla oblongata detektiert. Während die peripheren Chemorezeptoren vor allem auf veränderte Werte des pO_2 reagieren, sind die zentralen Rezeptoren eher auf Veränderungen des pCO_2 sensibilisiert (Lugliani et al. 1971; Silbernagl und Despopoulos 2012). Bei Hypoxie und Hyperkapnie kommt es zu einem verstärkten Atemantrieb (Berthon-Jones und Sullivan 1984) und zur Sympathikusaktivierung, welche über eine Adrenalin- und Noradrenalin-Ausschüttung zur Erhöhung des Blutdrucks und der Herzfrequenz führt. Eine Weckreaktion (Arousal) ist die Folge, durch welche der Atemfluss wiederhergestellt und der hypoxische Zustand

beendet wird (Somers et al. 2008). Durch den während der Apnoe- und Hypopnoe-Phasen verstärkten Atemantrieb kann es zu einem sogenannten „ventilatory overshoot“ kommen, was eine Hyperventilation mit Hypokapnie zur Folge hat. Dempsey et al. beobachteten, dass ventilatorische Overshoots den Hypopnoe- und Apnoe-Intervallen in vielen Fällen sowohl vorausgehen als auch diese terminieren (Dempsey et al. 2004).

Die Verengung der oberen Atemwege hat des Weiteren eine Verstärkung des negativen intrathorakalen Drucks bei Kontraktion der Inspirationsmuskeln zur Folge. Es kommt zu einem erhöhten venösen Blutrückstrom zum rechten Herzen, was auf Dauer zu einer Rechtsherzbelastung mit Verschiebung des Septums nach links und diastolischer Funktionseinschränkung des linken Ventrikels führen kann (Shiomi et al. 1991).

1.1.4 Risikofaktoren

Wie bereits in den vorangehenden Abschnitten angesprochen, gibt es einige stark für OSAS prädisponierende Risikofaktoren. So korreliert die Inzidenz schlafbezogener Atemstörungen unter anderem mit dem Alter, dem Geschlecht, dem Body Mass Index (BMI), Taille-Hüft-Verhältnis und metabolischen Parametern wie dem Serumcholesterinspiegel (Tishler et al. 2003). Der Hauptrisikofaktor ist dabei Adipositas (Prabhat et al. 2012), d.h. ein BMI $> 30\text{kg/m}^2$, der eng mit dem AHI korreliert (Aslan et al. 2013). Den Zusammenhang zwischen einem hohen Körpergewicht und dem Schweregrad einer schlafbezogenen Atemstörung konnten auch Peppard et al. in einer prospektiven Kohortenstudie zeigen (Peppard et al. 2000). Dabei führte eine Gewichtszunahme der Teilnehmer um 10% zu einem Anstieg des AHI um 32%, eine Gewichtsabnahme um 10% hingegen zu einem Abfall des AHI um 26%. Die Wahrscheinlichkeit gesunder Probanden, ein mittelgradig bis schweres OSAS zu entwickeln, erhöhte sich durch eine 10%ige Gewichtszunahme um das 6-fache (Peppard et al. 2000). Von besonderer Bedeutung ist im Hinblick auf die Pathogenese der Atemwegsobstruktion jedoch nicht das Übergewicht selbst, sondern der damit einhergehende dickere Nackenumfang. Das Fettgewebe am Hals verdrängt andere Strukturen und begünstigt die Verengung der Atemwege. Der Nackenumfang im Verhältnis zur Körpergröße kann somit im Vergleich zu Adipositas allgemein als ein bedeutungsvollerer Prädiktor angesehen werden (Davies et al. 1992).

Weitere wichtige Risikofaktoren für die Entwicklung eines OSAS sind das Alter sowie das männliche Geschlecht (Young et al. 1993). Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung liegt bei ca. 50 Jahren (Young et al. 2002) und die Prävalenz unter den 50-70-Jährigen wird auf 6% geschätzt (Zamarron et al. 1999). Männer sind häufiger von

Schnarchen und nächtlichen Atempausen betroffen (Ohayon et al. 1997). Ursache dafür ist, dass Männer im Vergleich zu Frauen zwar weniger Körperfett besitzen, sich dieses jedoch vor allem am Oberkörper konzentriert. Dementsprechend finden sich bei Männern auch meist mehr Fettgewebe im Bereich von Hals und weichem Gaumen sowie ein größerer Nackenumfang, was die Verengung der Atemwege begünstigt (Whittle et al. 1999).

Neben dem dickeren Nackenumfang prädisponieren auch andere anatomische Besonderheiten bzw. strukturelle Veränderungen im Kopf-Hals-Bereich für das Krankheitsbild, wie beispielsweise Mikro- und Retrognathie, vergrößerte Tonsillen, Makroglossie, tiefsitzende knöcherne Strukturen des Pharynx wie z.B. das Zungenbein (Cistulli 1996), aber auch vorangegangene Halswirbelsäulenverletzungen oder funktionale Veränderungen infolge von Schlaganfällen (Sankri-Tarbichi 2012). Weiterhin konnte eine Assoziation mit endokrinologischen Erkrankungen wie Hypothyreose gezeigt werden (Shepertycky et al. 2005), aber auch der spätabendliche Konsum von Alkohol, Nikotin und Medikamenten (z.B. Sedativa) kann eine Verengung der Atemwege durch Herabsetzung des Muskeltonus begünstigen (Banno und Kryger 2007; Punjabi 2008).

Wie Abbildung 3 abschließend noch einmal verdeutlichen soll, ist die Genese des OSAS multifaktoriell.

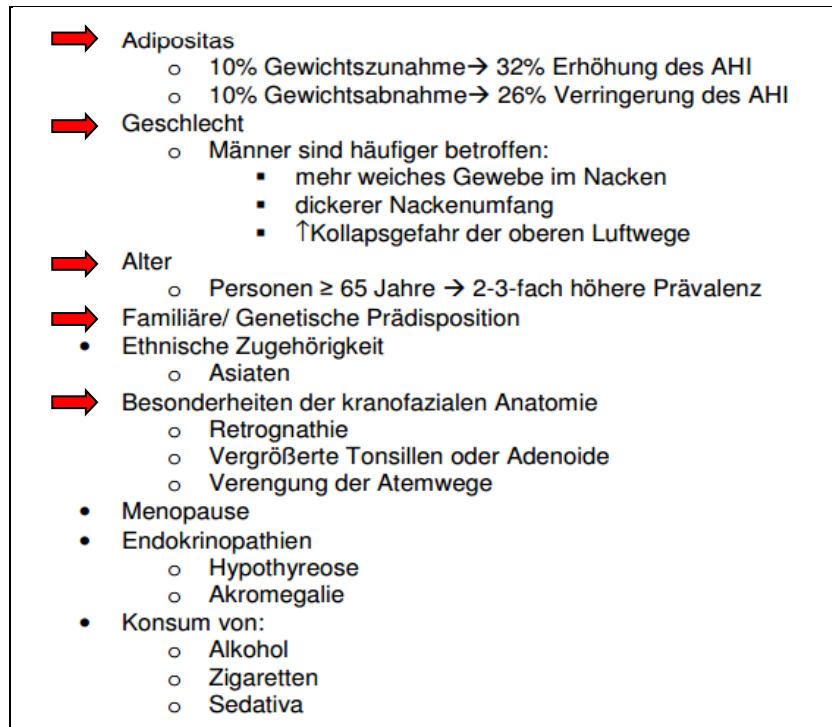


Abbildung 3: Übersicht der Risikofaktoren des OSAS

Die Hauptrisikofaktoren des OSAS sind Übergewicht, männliches Geschlecht, Alter über 65 Jahren, genetische Prädisposition sowie anatomische Besonderheiten (Dissertation Kraut 2014, modifiziert).

1.1.5 Therapie

Bei der Therapie des OSAS unterscheidet man die konservative, die apparative und die operative Therapie.

Die wichtigste Komponente der konservativen Therapie ist die Reduktion des Hauptrisikofaktors Übergewicht. Laut Young et al. ist dies die einzige evidenzbasierte Maßnahme (Young et al. 2002); weitere konservative Therapieformen wie Verzicht auf Alkohol, Nikotin und Sedativa in den späten Abendstunden sowie Einhaltung eines regelmäßigen Schlafrhythmus sind zwar empfehlenswert, die Wirksamkeit konnte in Studien jedoch nicht belegt werden. Durch Vermeidung der Rückenlage während des Schlafes kann eine Reduktion des AHI erzielt werden (Cartwright et al. 1985; Kavey et al. 1985; Maurer et al. 2003; Wenzel et al. 2007); eine medikamentöse Therapie des OSAS steht jedoch nicht zur Verfügung (Smith et al. 2006).

Die apparative Therapie des OSAS beinhaltet die nasale Beatmungstherapie mit Überdruck und orale Hilfsmittel. Die nasale Beatmungstherapie wird auch *continuous positive airway pressure* (CPAP)-Beatmung genannt und gilt als Goldstandard in der Therapie des OSAS (Baguet et al. 2012). Der Patient trägt dabei während des Schlafes eine Nasenmaske, über welche die Spontanatmung mit einem dauerhaften positiven

endexpiratorischen Druck (PEEP) unterstützt wird. Auf diese Weise wird der Kollaps der oberen Atemwege durch pneumatische Schienung verhindert und somit der Kreislauf aus intermittierender Hypoxie und Reoxygenierung unterbrochen. Der positive Effekt dieser Therapie zeigt sich sowohl durch eine Besserung der Symptomatik, wie beispielsweise Schnarchen und Tagesmüdigkeit, als auch durch eine Minderung des kardiovaskulären Risikos (Jenkinson et al. 1999; Ballester et al. 1999; Giles et al. 2006). Die in Kapitel 1.1.4 angesprochene Volumenminderung der grauen Hirnsubstanz und die daraus folgenden kognitiven Störungen sind unter CPAP-Beatmung ebenfalls regredient, was neben einer frühen Diagnosestellung vor allem die Bedeutung einer konsequenten Therapie verdeutlicht (Canessa et al. 2011).

Wenn eine fehlende Compliance jedoch zum Therapieabbruch führt, wie es insbesondere bei Frauen, Patienten mit einem milden OSAS und geringer Symptomatik der Fall ist (Pelletier-Fleury et al. 2001), können bei entsprechender Anatomie orale Hilfsmittel wie Unterkieferprotrusionsschienen eingesetzt oder eine operative Therapie durchgeführt werden. Auch die operativen Maßnahmen richten sich nach der zugrundeliegenden Pathophysiologie des Betroffenen. Möglich sind dabei nasale Eingriffe, Uvulopalatopharyngoplastiken (UPPP) mit oder ohne Tonsillektomie, Weichgaumenimplantate und ähnliches (AWMF-S2-Leitlinie 2009).

1.2 OSAS als kardiovaskulärer Risikofaktor

1.2.1 Mechanismen

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass das OSAS zur Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen beiträgt. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen sind vielfältig und in Abbildung 4 schematisch dargestellt, wobei Zamarrón et al. den Ausgangspunkt des Geschehens in den Hypoxämie/Reoxygenierungs-Episoden und der Schlaffragmentierung sehen (Zamarrón et al. 2013).

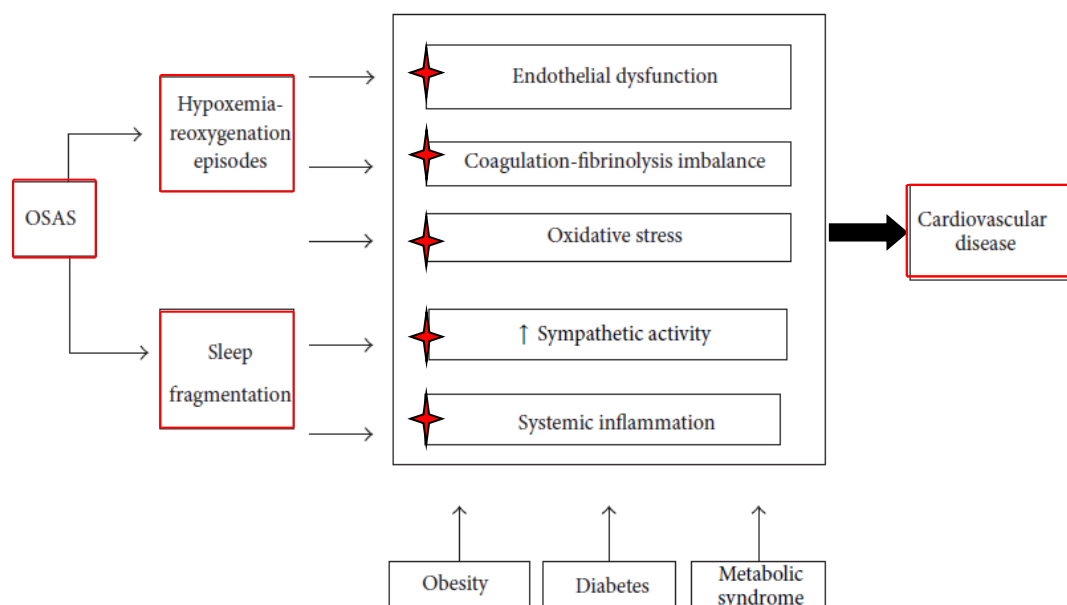


Abbildung 4: OSAS als kardiovaskulärer Risikofaktor

Dargestellt sind die Pathomechanismen, welche im Rahmen des OSAS zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen (Zamarrón et al. 2013, modifiziert).

Die wiederholten nächtlichen Apnoe-Hypopnoe-Episoden im Rahmen des OSAS gehen mit einem Wechsel zwischen Hypoxie und Hyperkapnie (beim Verschluss der Atemwege) und Reoxygenierung und Hypokapnie (infolge des Arousals) einher, wobei die wiederholten Weckreaktionen zu einer Störung der physiologischen Schlafstruktur führen. Eine schwere Beeinträchtigung des Schlafes kann dabei gesundheitliche Folgen nach sich ziehen, die durch die Entstehung entzündlicher Prozesse im Körper sowie eine Aktivierung des Sympathikus und Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) bedingt sind (Patel et al. 2009; Zamarrón et al. 2013).

Die repetitiven hypoxämischen Zustände führen neben der Aktivierung des Sympathikus und einer erhöhten Freisetzung von Katecholaminen ebenfalls zur Bildung freier

Sauerstoffradikale, welche oxidativen Stress verursachen und infolge ihrer großen Reaktionsfreudigkeit zur Schädigung des Gefäßendothels beitragen (Dimsdale et al. 1995; Zamarrón et al. 2013). Störungen der Funktionen des Endothels, zu welchen die Modulation des Gefäßtonus, die Regulation der Gefäßpermeabilität und die Anpassung der antithrombotischen und antiadhäsiven Eigenschaften der Gefäßwand zählen, werden als endotheliale Dysfunktion bezeichnet und begünstigen die Entwicklung von Arteriosklerose (Kelm und Strauer, B. E. 1999; Bonetti et al. 2003). Infolge von oxidativem Stress kommt es im Rahmen der endothelialen Dysfunktion auch zur Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthase, welche für die Bildung des Gefäßmuskel-relaxierenden und somit vasodilatativ wirksamen Stickstoffmonoxids (NO) aus der Aminosäure Arginin zuständig ist. Dies führt in Kombination mit den erhöhten Angiotensin II-Spiegeln und der verstärkten Sympathikusaktivität zu einer peripheren Vasokonstriktion, was die Entstehung einer arteriellen Hypertonie begünstigt.

Die freien Sauerstoffradikale und der oxidative Stress infolge CIH induzieren außerdem neben der Bildung verschiedener Peptidhormone wie beispielsweise dem vasokonstriktorisch wirksamen Endothelin-1 auch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, zu denen neben pro-angiogenetischen Molekülen (Hypoxie induzierter Faktor 1 HIF-1, Vascular endothelial growth factor VEGF) auch der Nukleäre Faktor-kappa B (NF-kB) als Hauptregulator der Entzündungsantwort gehört. Es kommt zur Ausschüttung entzündungsfördernder Zytokine, was durch Auslösung einer systemischen Inflammation die endotheliale Dysfunktion und die erhöhte Sympathikusaktivität weiter verstärkt (Baguet et al. 2012; Zamarrón et al. 2013).

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass OSAS-Patienten im Vergleich zu gesunden Menschen erhöhte Gewebe- bzw. Blutserumspiegel der Entzündungsmediatoren C-reaktives Protein (CRP), Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-6 und Cyclooxygenase (COX) 2 aufweisen (Minoguchi et al. 2004; Imagawa et al. 2004; Ciftci et al. 2004; Ryan et al. 2005; Kokturk et al. 2005; Bravo et al. 2007; Tsatsanis et al. 2006; Beaudin et al. 2014). Die Zytokine TNF- α und IL-6 führen ihrerseits ebenfalls zu einer Induktion des NF-kB-Signalweges, sodass die Entzündungsreaktion weiter verstärkt wird (Ghosh et al. 1998).

Die systemische Inflammation fördert jedoch nicht nur die endotheliale Dysfunktion, sondern trägt auch zur Entwicklung der Arteriosklerose bei (Ross 1999). Infolge der entstehenden Endothelläsionen wird das Gerinnungssystem aktiviert, sodass bei Patienten mit OSAS erhöhte Konzentrationen an Gerinnungsfaktoren (Reinhart et al. 2002; Kanel et al. 2005; Zamarron et al. 2008; Akinnusi et al. 2009) und D-Dimeren

detektiert werden konnten, wobei die Spiegel der D-Dimere mit der Schwere der nächtlichen Hypoxie korrelierten (Shitrit et al. 2005).

Die Mechanismen, die im Rahmen des OSAS zur Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen führen, sind in Abbildung 4 getrennt voneinander aufgeführt, jedoch handelt es sich hierbei um ein Zusammenspiel aus pathologischen Vorgängen, welche sich gegenseitig bedingen und beeinflussen. Auf die einzelnen Komorbiditäten soll im Folgenden eingegangen werden.

1.2.2 OSAS und arterielle Hypertonie

Die arterielle Hypertonie ist eine häufige Komorbidität des OSAS. Der zugrundeliegende Pathomechanismus liegt in der Kombination aus gesteigerter Sympathikusaktivität, erhöhten Katecholaminspiegeln, endothelialer Dysfunktion und peripherer Vasokonstriktion begründet, wie bereits im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde. Mehr als 50% der OSAS-Patienten sind von arterieller Hypertonie betroffen (Baguet et al. 2005; Dursunoglu et al. 2005), umgekehrt leiden etwa 30-40% der Hypertoniker an einem OSAS (Somers et al. 2008). Die Assoziation zwischen OSAS und arterieller Hypertonie konnte in einer Vielzahl von Studien belegt werden und besteht unabhängig von anderen Faktoren wie Geschlecht, Alter und Gewicht (Fletcher 1995; Nieto et al. 2000; Peppard et al. 2000). Außerdem kann eine lineare Korrelation zwischen dem Grad der Hypertonie und dem AHI beobachtet werden, wobei die Assoziation bei übergewichtigen OSAS-Patienten stärker ausfällt (Young et al. 1997; Nieto et al. 2000; Peppard et al. 2000; Young et al. 2002).

Das OSAS wirkt sich dabei sowohl auf die systolischen als auch die diastolischen Blutdruckwerte aus, wobei dies am Tag sowie in der Nacht gilt. Somers et al. zeigten, dass bei OSAS-Patienten der nächtlich gemessene Blutdruck die Tageswerte teilweise sogar übersteigen kann, korrelierend mit der erhöhten Sympathikusaktivität in der Nacht (Somers et al. 1995). Die physiologische nächtliche Senkung des Blutdrucks um ca. 10-20% des Tageswertes, das sogenannte „Dipping“, wird folglich durch OSAS aufgehoben; man spricht bei den Patienten von „Non-Dippen“. Den Betroffenen fällt in der Selbstmessung nicht selten ein erhöhter frühmorgendlicher Blutdruck auf, welcher in Verbindung mit einem geringeren abendlichen Blutdruckwert ein OSAS wahrscheinlich werden lässt (Kario et al. 2006; Matsui et al. 2009; Kario 2009).

In vielen Fällen werden die Patienten vor Diagnosestellung des OSAS aufgrund einer arteriellen Hypertonie therapiert, die zunächst als essentielle Hypertonie eingestuft wird, aufgrund der meist bestehenden Therapieresistenz jedoch weitere Diagnostik erfordert

(Otake et al. 2002; Smith et al. 2002). In bis zu 80% der Fälle einer therapieresistenten Hypertonie ist ein OSAS ursächlich (Williams et al. 1985; Hirshkowitz et al. 1989; Logan et al. 2001), insbesondere bei Patienten unter 50 Jahren (Grote et al. 2000; Calhoun et al. 2008). Im Zuge der Hochregulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zeigen OSAS-Patienten mit therapieresistenter Hypertonie häufig sowohl gesteigerte Angiotensin-II-Konzentrationen (Takahashi et al. 2005) als auch erhöhte Aldosteron-Spiegel, wobei hier ebenfalls eine Korrelation zum AHI erkennbar ist (Pratt-Ubunama et al. 2007).

Wie schnell sich Blutdruckveränderungen infolge CIH einstellen können, demonstrierten Tamisier et al. an gesunden Probanden (Tamisier et al. 2011). Sie konnten zeigen, dass repetitive hypoxische Zustände bereits nach zwei Wochen zu einem Anstieg des arteriellen Blutdrucks führen. Dabei wurde eine Steigerung des systolischen Wertes um bis zu 8 mmHg, eine Erhöhung des diastolischen Wertes um bis zu 5 mmHg sowie eine signifikante Zunahme der Sympathikusaktivität beobachtet. Anhand dieser Tatsache kann bereits auf die Bedeutung einer möglichst frühzeitigen Diagnosestellung mit baldigem Beginn einer Therapie geschlossen werden.

1.2.3 Koronare Herzerkrankung und Schlaganfälle

Patienten, die an OSAS leiden, weisen oft begleitend eine Vielzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren auf, wie z.B. arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ II, Hyperlipidämie, Nikotinabusus und Übergewicht. Damit einhergehend kann bei diesen Patienten eine im Vergleich zur Gesamtbevölkerung erhöhte Prävalenz von koronarer Herzerkrankung (KHK) und Schlaganfällen (Moore et al. 2001; Peker et al. 2006) sowie eine erhöhte Mortalität beobachtet werden (Peker et al. 2000). Neben den oben genannten Risikofaktoren stellt das OSAS jedoch auch unabhängig von anderen Faktoren einen signifikanten Prädiktor für die KHK dar, wie Gottlieb et al. im Rahmen der prospektiven Sleep Heart Health Studie an 4422 Probanden zeigen konnten (Gottlieb et al. 2010). So haben männliche OSAS-Patienten im Alter von 40-70 Jahren und einem AHI >30 ein um 68% höheres Risiko für die Entwicklung einer KHK (Myokardinfarkt, Revaskularisationstherapie oder Tod implizierend) als gleichaltrige Probanden mit einem AHI <5. Bei Patienten >70 Jahren und bei Frauen konnte diese Korrelation jedoch nicht gezeigt werden (Gottlieb et al. 2010).

Laut Banno und Kryger trägt insbesondere die nächtliche Blutdruckerhöhung („Non-Dipping“) dazu bei, dass OSAS-Patienten ein erhöhtes Risiko für weitere kardiovaskuläre Erkrankungen aufweisen (Banno und Kryger 2007), so findet sich vor

allem eine erhöhte Prävalenz hypertoniebedingter Schlaganfälle (Ishikawa et al. 2007; Kokubo et al. 2008). Poza et al. konnten anhand einer Analyse von 79 Schlaganfall-Patienten zeigen, dass 29% dieser Betroffenen an einem OSAS litten, was die atembezogene Schlafstörung als einen unabhängigen Risikofaktor für ischämische Hirninfarkte bei Personen <65 Jahren erscheinen lässt (Poza et al. 2000).

Das Risiko für ein kardiovaskuläres oder zerebrovaskuläres Ereignis kann jedoch bei Männern durch konsequente Behandlung mittels CPAP-Therapie wieder signifikant reduziert werden (Capodanno et al. 2014).

1.2.4 Diabetes

Das OSAS wird weiterhin mit Insulinresistenz, Glukoseintoleranz und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II in Verbindung gebracht, wobei diese Assoziation unabhängig von anderen Einflussfaktoren wie Adipositas besteht (Pamidi et al. 2010; Punjabi et al. 2002). Unter OSAS-Patienten ist die Prävalenz von Diabetes mellitus Typ II signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten ohne schlafbezogene Atemstörung (Reichmuth et al. 2005; Seicean et al. 2008; Ronksley et al. 2009; Botros et al. 2009), ebenso wie andererseits die Prävalenz von OSAS unter Diabetikern verglichen mit Nicht-Diabetikern (West et al. 2006). Als zugrundeliegende Pathomechanismen werden auch hier die Aktivierung von Sympathikus, inflammatorischen Signalkaskaden und der Hypothalamus-Hypophysen-Achse infolge von chronisch intermittierender Hypoxie und Schlaffragmentierung gesehen (Jun und Polotsky 2009). Folge ist nicht nur eine mit dem Grad des Sauerstoffsättigungsabfalls korrelierende, gestörte Glucosetoleranz, sondern auch eine mit steigendem AHI zunehmende Insulinresistenz (Punjabi et al. 2002) mit erhöhten Insulin-Plasmaspiegeln (Ip und Mary et al. 2002).

1.2.5 Effekt der CPAP-Therapie

Wie bereits unter Punkt 1.1.5 beschrieben, beeinflusst eine konsequente CPAP-Therapie durch eine Verbesserung des Schlafes (Follenius et al. 1991) nicht nur die Symptomatik positiv, sondern mindert auch das kardiovaskuläre Risiko.

So reduziert sich in der Folge nicht nur die Sympathikusaktivität (Maser et al. 2008) und die endotheliale Dysfunktion (Kohler et al. 2011), auch die Konzentrationen der pro-inflammatorischen Marker TNF- α und IL-6 (Steiropoulos et al. 2009) sowie der Katecholamine werden nachweislich vermindert (Minemura et al. 1998). Der oxidative

Stress wird reduziert und die NO-Synthase-Aktivität gesteigert, was infolge der vasodilatativen Wirkung von NO den peripheren Gefäßwiderstand verbessert (Alonso-Fernandez et al. 2009).

Auf diese Weise kann bereits durch eine vierwöchige CPAP-Beatmung eine Senkung des diastolischen Blutdrucks erreicht werden (Faccenda et al. 2001), wobei eine Langzeitbehandlung durch Normalisierung der Renin-, Aldosteron- (Follenius et al. 1991) und Angiotensin II-Plasmaspiegel auch die physiologische nächtliche Blutdrucksenkung („Dipping“) wiederherstellen kann (Akashiba et al. 1999).

Auch die diabetische Stoffwechsellage kann durch die Überdruckbeatmung positiv beeinflusst werden. Neben einer Verminderung des postprandialen Blutzuckerspiegels und des Hämoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) (Babu et al. 2005) kann durch eine zweiwöchige CPAP-Beatmung sowohl die Glukosetoleranz im oralen Glukose-Toleranz-Test als auch die Insulin-Sensivität und Insulin-Sekretion wie oben erwähnt verbessert werden (Pamidi et al. 2015).

1.3 OSAS und die Auswirkungen auf das Herz

1.3.1 Kapillarisation des Myokards

Die im Rahmen des OSAS auftretende CIH führt zum Abfall des p_aO_2 und im Folgenden auch zur Sauerstoffunterversorgung von Zellen, was die Aktivierung des HIF-Signalweges zur Folge hat. Dieser induziert eine Vielzahl weiterer Transkriptionsfaktoren und ermöglicht auf die Weise die Anpassung des Gewebes an hypoxische Bedingungen und das Überleben der Zelle.

Unter normoxischen Bedingungen verbrauchen die Mitochondrien einen Großteil des verfügbaren Sauerstoffes für die Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese zur Deckung des zellulären Energiebedarfs (Rolfe und Brown 1997). Der verbleibende Sauerstoffanteil wird für andere Zellprozesse genutzt, wie beispielsweise für die Inhibierung von HIF. Der für die zelluläre Anpassung an das Sauerstoffangebot verantwortliche HIF-1 besteht aus einer α - und einer β - Untereinheit (Bardos und Ashcroft 2005), wobei die α -Untereinheit sauerstoffabhängig hydroxyliert und in der Folge durch Hoppel-Lindau-Proteine abgebaut wird (Fandrey et al. 2006). Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 angesichts der fehlenden Hydroxylierung oder durch NF- κ B (van Uden et al. 2008; Rius et al. 2008) aktiviert und die Produktion von Erythropoetin (EPO), VEGF, Glukose-Transportern (GLUT 1 und 3) und der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) stimuliert (Schofield und Ratcliffe 2004; Cummins und Taylor 2005). Die Aktivierung der iNOS erhöht über eine Vasodilatation die Gewebepfusion, während durch die erhöhte Expression der Glukosetransporter eine verbesserte Energiebereitstellung durch gesteigerte Glukose-Aufnahme und Glykolyse erzielt werden kann. Der Wachstumsfaktor VEGF induziert eine Gefäßneubildung, durch Stimulation der EPO-Produktion wird die Zahl der für den Sauerstoff-Transport zuständigen Erythrozyten erhöht, was die Oxygenierung des Blutes verbessert (Cummins und Taylor 2005a).

VEGF ist ein Molekül, dessen Isoform VEGF-A proliferativ auf Endothelzellen wirkt und die Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) vorantreibt. Des Weiteren vermittelt das Protein die Migration von Monozyten und Makrophagen, inhibiert den programmierten Zelltod (Apoptose) (HUGO Gene Nomenclature Committee 2008) und ist an der Entstehung von Arteriosklerose beteiligt (Takahashi et al. 2005; Lorier et al. 2011). VEGF-A vermittelt seine Wirkung über die Bindung an zwei verschiedene Tyrosinkinase-Rezeptoren: VEGF-Rezeptor 1 und VEGF-Rezeptor 2 (Kinase insert domain receptor, KDR). KDR stellt dabei den Hauptmediator der VEGF-A-induzierten Angiogenese dar,

infolge dessen Aktivierung es neben der Inhibierung apoptotischer Vorgänge zu einer Rekrutierung, Migration und Proliferation von Endothelzellen kommt (HUGO Gene Nomenclature Committee 2008). Das vorhandene Kapillarnetz stellt hierbei den Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Kapillaren dar (Lorier et al. 2011). Die Isoform VEGF-B hingegen spielt bei Entstehung und Wachstum neuer Blutgefäße keine Rolle; dennoch ist das Protein essentiell für das Überleben der neu entstandenen Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Perizyten. Ermöglicht wird dies durch die Regulation einer Vielzahl von Genen durch VEGF-B, zu welchen unter anderem der VEGF-Rezeptor 1 gehört (Zhang et al. 2009).

Teramoto et al. konnten im Jahre 2003 anhand von 24 an OSAS leidenden Patienten zeigen, dass die im Rahmen des Syndroms auftretende nächtliche Hypoxie zu signifikant erhöhten Serumspiegeln von VEGF führt (Teramoto et al. 2003). Auch Schulz et al. wiesen erhöhte VEGF-Serumspiegel bei Patienten mit schwerem OSAS nach; der Anstieg der Werte korrelierte mit dem Ausmaß des nächtlichen Sauerstoffsättigungsabfalls der Patienten (Schulz et al. 2002). Durch eine Sauerstoffapplikation während des Schlafes (2L/min per Nasensonde) konnten die erhöhten VEGF-Spiegel wieder gesenkt werden, was die Abhängigkeit der Expression angiogenetischer Marker von Hypoxie nochmals unterstreicht (Teramoto et al. 2003). Im Gegensatz zu diesen Studien konnte Maeder et al. beim Vergleich von Patienten mit mildem OSAS zu Patienten mit einer schweren Form dem Schweregrad der schlafbezogenen Atemstörung jedoch kein Einfluss auf die Höhe der Serumspiegel von VEGF zusprechen (Maeder et al. 2014).

Neben der Hypoxie zählt außerdem ein erhöhter Serumspiegel von Angiotensin II zu den Hauptstimulatoren der VEGF-Expression. Patienten mit OSAS weisen neben den erhöhten VEGF-Werten auch eine verstärkte Angiotensin II-Aktivität in den Leukozyten auf, welche im Hinblick auf die Pathogenese von Vaskularisierung und endothelialer Dysfunktion bei OSAS-Patienten durchaus von Bedeutung ist (Takahashi et al. 2005)

Erste humane Biopsiestudien zeigten, dass die Hochregulation des für die Angiogenese zuständigen Wachstumsfaktors VEGF möglicherweise zu einer erhöhten Kapillardichte im Skelettmuskel von OSAS-Patienten führt. Dabei kommt es theoretisch zu einer signifikanten Zunahme des Anteils an proliferierenden Endothelzellen sowie zu einer verstärkten Expression von VEGF durch die hypoxischen Endothelzellen (Wahlin-Larsson et al. 2009; Lorier et al. 2011). Dieser Effekt, bisher nur am M. tibialis ant. des Menschen getestet, konnte im Rattenmodell am Myokard gezeigt werden: Wang et al.

untersuchten neben der myokardialen Kapillardichte auch die Expression angiogenetischer Marker sowie das Vorhandensein von apoptotischen Vorgängen in Abhängigkeit von der Dauer der intermittierenden Hypoxie (1, 7, 14 und 28 Tage) (Wang und Si 2013). Bereits nach kurzer Zeit zeigte sich eine Hochregulation der messenger Ribonukleinsäure (mRNA) und Proteinlevel von HIF-1 α , VEGF und B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), welche am 7. Tag den Höchstwert erreichte. Eine signifikante Zunahme der Kapillardichte konnte jedoch erst nach einer Dauer der Hypoxie-Exposition von 28 Tagen detektiert werden, wobei zu diesem Zeitpunkt außerdem die Induktion apoptotischer Vorgänge beobachtet wurde (Wang und Si 2013).

Im Hinblick auf die angiogenetischen Vorgänge sollte auch der Proteinfamilie Notch besondere Beachtung geschenkt werden, welche neben der Regulation von Zelldifferenzierung und Zellinteraktionen auch direkte Effekte auf Angiogenese und Apoptose ausübt (Miele und Osborne 1999). Das Gen wurde erstmals in der Fliege *Drosophila melanogaster* beschrieben und kodiert für Transmembran-Proteine (HUGO Gene Nomenclature Committee 2008), die im Gefäßsystem des Menschen exprimiert werden (Lindner et al. 2001). Man unterscheidet Notch 1, 2, 3 und 4, wobei Notch 1 und 4 im Endothel von Arterien und Venen lokalisiert sind und Notch 3 in glatten Gefäßmuskelzellen zu finden ist (Rizzo et al. 2014). Stimulus für die Expression des Gens sind Gefäßverletzungen, Myokardschädigungen (Lindner et al. 2001) und der NF- κ B-Signalweg (Wang et al. 2001; Quillard et al. 2010). Im Rahmen der Angiogenese interagieren Notch und sein hochaffiner Ligand Delta-like ligand 4 (Dll4) mit VEGF-A und sorgen für das Gleichgewicht zwischen aussprossenden und gefäßbildenden Zellen (Jakobsson et al. 2009). Die Bedeutung von Notch für die Angiogenese wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass das Molekül auch in Abwesenheit von VEGF-A eine Gefäßneubildung über den Notch-abhängigen VEGF-Rezeptor 3 (VEGFR3) induzieren kann (Benedito et al. 2012). Unter Suppression des Notch/Dll4-Signalweges wird die Angiogenese vor allem durch Hypoxie-vermittelte VEGF-Erhöhung moduliert (Watson et al. 2013), jedoch kann diese nur in Anwesenheit von Notch die volle Wirkung entfalten (Takeshita et al. 2007). Dem Protein wird des Weiteren eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und Reperfusion ischämischer Extremitäten zugesprochen (Liu et al. 2012; Trindade et al. 2012).

Infolge der CIH kommt es bei OSAS-Patienten HIF-vermittelt auch zu einer verstärkten Produktion von EPO, dem Wachstumsfaktor für die Bildung und Differenzierung von Erythrozyten und Thrombozyten im Rahmen der Hämatopoese (Cahan et al. 1995;

Imagawa et al. 2001). Das Protein wird vor allem in den Endothelzellen und Fibrozyten der Niere gebildet (Watkins et al. 1986; Wang und Semenza 1993); die Expression korreliert mit dem Ausmaß der Hypoxie (Jelkmann 1992) bzw. dem AHI. In der Folge kann bei OSAS-Patienten im Rahmen der Anpassungsvorgänge an Gewebshypoxie eine erhöhte Anzahl an Erythrozyten (Moore-Gillon und Cameron 1985), ein erhöhter Hämoglobin (Hb)-Spiegel (Imagawa et al. 2001) sowie ein erhöhter Hämatokrit detektiert werden (Fan et al. 2005).

1.3.2 Kardiales Remodeling

1.3.2.1 Fibrosierung des Myokards und Arrhythmien

Wie in Kapitel 1.2.1 bereits beschrieben wurde, weisen Patienten mit OSAS infolge der RAAS-Hochregulierung erhöhte Plasma-Aldosteron-Spiegel auf (Pratt-Ubunama et al. 2007). Es ist bekannt, dass diese gesteigerten Aldosteron-Konzentrationen über die Stimulierung der Expression von pro-fibrotischen Molekülen (z.B. transforming growth factor- β 1) mit kardialem Remodelling einhergehen, aus welchem Grund auch Aldosteron-Antagonisten ein fester Bestandteil der Therapie nach Myokardinfarkt sind (Marney und Brown 2007).

Kardiales Remodelling ist definiert als eine Veränderung des Herzens infolge Herzinfarkt, Druck- oder Volumenbelastung oder Entzündung, die sich molekular, zellulär und interstitiell manifestiert und klinisch in Form einer kardialen Funktionsstörung in Erscheinung tritt (Gajarsa und Kloner 2011; Frangogiannis 2014). Die interstitiellen fibrotischen Veränderungen können anhand der Marker Prokollagen Typ I und Typ III im Serum detektiert werden, wobei bei OSAS-Patienten in Korrelation mit dem Schweregrad ihrer linksventrikulären Funktionseinschränkung signifikant erhöhte Spiegel dieser Fibrose-Marker nachgewiesen werden konnten (Baguet et al. 2012). Auch die Fibrose-induzierenden Gene zeigten sich infolge der CIH hochreguliert (Fan et al. 2005).

In diesem Zusammenhang sollte weiterhin Notch Erwähnung finden, dessen Isoform 1 eine zentrale Rolle im Rahmen des kardialen Remodelings einnimmt und zur Reduktion dieser pathologischen Vorgänge beiträgt. Dabei unterstützt die Aktivierung von Notch1 im infarzierten Myokard das Überleben der Kardiomyozyten, induziert die Proliferation kardialer Stammzellen sowie deren Differenzierung zu Kardiomyozyten und treibt die Angiogenese voran (Rizzo et al. 2014). Eine Übersicht über diese Notch1-vermittelten Prozesse gibt Abbildung 5.

Die Isoform Notch3 hingegen konnte mit der Differenzierung von Makrophagen und anderen pro-inflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht und gemeinsam mit dem Liganden Dll4 in arteriosklerotischen Plaques detektiert werden (Fung et al. 2007), währenddessen die Inhibierung des Dll4-vermittelten Notch3-Signalweges zur signifikanten Verminderung der arteriosklerotischen Prozesse führte (Fukuda et al. 2012).

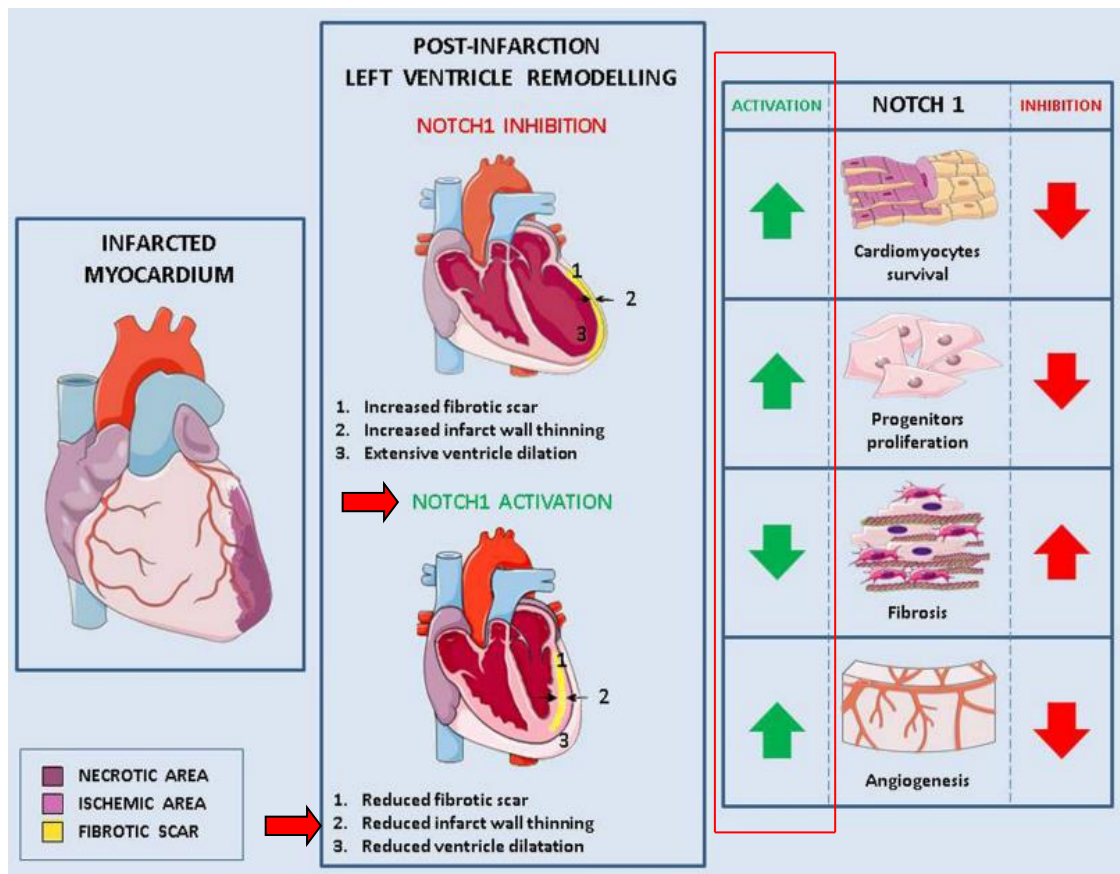


Abbildung 5: Die Bedeutung von Notch für kardiales Remodeling

Nach akutem Myokardinfarkt begünstigt Notch das Überleben der Kardiomyozyten, fördert sowohl Angiogenese als auch die Proliferation von Progenitorzellen und vermindert fibrotische Umbauvorgänge des infarzierten Gewebes (Rizzo et al. 2014, modifiziert).

Wie in Abbildung 5 dargestellt ist, führt eine Notch1-Inhibition zur gesteigerten interstitiellen Fibrosierung des Myokards. Damit einhergehend steigt auch das Risiko für Arrhythmien, von welchen nahezu die Hälfte aller OSAS-Patienten betroffen ist (Hayashi et al. 2008). Neben Sinusarresten und AV-Blöcken können insbesondere ventrikuläre Extrasystolen (VES) beobachtet werden (Guilleminault et al. 1983), deren Häufigkeit signifikant mit der Schwere des Sauerstoffsättigungsabfalls zunimmt (Shepard et al. 1985). Während das Risiko für einen plötzlichen Herztod in der generellen Population zwischen 6 Uhr morgens und den frühen Nachmittagsstunden am höchsten ist, tritt

dieser bei OSAS-Patienten vor allem zwischen Mitternacht und 6 Uhr morgens auf. Das relative Risiko korreliert hierbei mit dem AHI der Patienten, was die Toxizität der Hypoxie für das Myokard verdeutlicht (Gami et al. 2005). Durch konsequente CPAP-Therapie kann dieses Risiko wieder gesenkt werden, wobei bereits eine einmonatige Behandlung die Häufigkeit der VES während des Schlafes um 58% reduziert (Ryan 2013).

Neben den ventrikulären Extrasystolen kann bei OSAS-Patienten weiterhin häufig Vorhofflimmern (VHF) infolge der atrialen Dilatation detektiert werden (Aslan et al. 2013). Auch umgekehrt zeigte sich die Prävalenz des Schlafapnoe-Syndroms bei Patienten mit VHF signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten mit anderen multiplen kardiovaskulären Risikofaktoren (Gami et al. 2004). Wird das VHF mittels Kardioversion therapiert, so haben Patienten mit unbehandeltem OSAS eine 82% höhere Wahrscheinlichkeit für ein Wiederauftreten der Herzrhythmusstörung im Vergleich zu Patienten, die eine CPAP-Beatmung erhalten (42%) (Kanagala et al. 2003).

1.3.2.2 Linksventrikuläre Hypertrophie

Die arterielle Hypertonie ist eine häufige Folgeerkrankung des OSAS. Es wird angenommen, dass ein unbehandelter Bluthochdruck über längere Zeit zur Entwicklung einer hypertensiven Herzkrankheit führt. Dies ist ein Krankheitsbild, das mit einer linksventrikulären Hypertrophie einhergeht und letztlich zur chronischen Herzinsuffizienz führen kann. Infolge der Druckbelastung der Ventrikel durch die arterielle Hypertonie kommt es zunächst zu einer Zunahme vor allem der linksventrikulären Herzmuskelmasse, was aufgrund des zunehmenden Sauerstoffbedarfs des Myokards eine Koronarinsuffizienz zur Folge hat. Außerdem schränkt die Hypertrophie die diastolische Füllungsfähigkeit der Ventrikel ein, sodass eine diastolische Dysfunktion entsteht (Motz et al. 1995; Schmieder und Messerli 2000; Schwab et al. 2009).

Passend zur Tatsache, dass ca. 50% aller OSAS-Patienten an Hypertonie leiden (Cloward et al. 2003; Dursunoglu et al. 2005), konnte in einer Vielzahl von Studien mittels Echokardiographie eine erhöhte Prävalenz für myokardiale Hypertrophie bei OSAS-Patienten gezeigt werden (Hedner et al. 1990; Kraiczi et al. 2001; Chami et al. 2008). Die Zunahme der Herzmuskelmasse wird neben einem hohen systolischen Wert (Haider et al. 2003) insbesondere durch die nächtliche Blutdruckerhöhung („Non-Dipping“) begünstigt, von der viele der Schlafapnoe-Patienten betroffen sind (Verdecchia et al. 1990). Noda stellte in einer Untersuchung von 51 OSAS-Patienten mittleren Alters eine Assoziation zwischen Hypertrophie und AHI fest. So zeigte sich bei Patienten mit einem milden OSAS (AHI <20) in 30% der Fälle eine linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) und

kein Fall mit rechtsventrikulärer Hypertrophie (RVH), während bei Patienten mit einem moderaten bis schweren OSAS (AHI >30) 50% der Betroffenen eine LVH und 30,5% eine RVH aufwiesen. Weiterhin konnte eine Korrelation der Dauer des nächtlichen SpO₂-Abfalls <90% mit der Schwere der linksventrikulären Hypertrophie festgestellt werden (Noda 1995). Jüngere Studien liefern ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Verbindung zwischen linksventrikulärer Hypertrophie und AHI (Cloward et al. 2003; Dursunoglu et al. 2005). So detektierten Dursunoglu et al. eine Zunahme der interventrikulären Septumdicke von durchschnittlich 9,9 mm bei einem milden OSAS (AHI 5-14) auf 11,2 mm bei der schweren Form (AHI >30) und eine Verbreiterung der linksventrikulären Hinterwand von 9,8 mm auf 11,4 mm (Dursunoglu et al. 2005). Auch Aslan et al. zeigten anhand einer Untersuchung von 80 Patienten, dass die moderate bis schwere Form des OSAS mit einer signifikanten Dickenzunahme des interventrikulären Septums einhergeht, wobei diese Beobachtung bereits vor Entwicklung einer Hypertonie oder einer anderen kardiovaskulären Begleiterkrankung gemacht werden konnte (Aslan et al. 2013). Diese Daten sprechen folglich dafür, dass die im Rahmen des OSAS auftretende kardiale Hypertrophie auch unabhängig von arterieller Hypertonie auftreten kann. Die Vorgänge sind jedoch reversibel: eine sechsmonatige CPAP-Therapie kann die Herzmuskelmasse wieder nachweislich reduzieren (Colish et al. 2012).

Die Mechanismen, die zur kardialen Hypertrophie führen, sind Gegenstand aktueller Forschung. Angesichts der aktuellen Studienlage wird die Aufmerksamkeit zunehmend auf die Interaktion zwischen der neuronalen NO-Synthase (nNOS), Calcineurin und der Plasmamembran-Ca²⁺-ATPase (PMCA) 4 gelenkt.

Bisher konnte gezeigt werden, dass eine Dehnung der Kardiomyozyten infolge Druckbelastung, wie sie beispielsweise im Rahmen der arteriellen Hypertonie auftritt, die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöht. Dies aktiviert die Ca²⁺-abhängige Phosphatase Calcineurin, welche den Transkriptionsfaktor nuclear factors of activated T cells 3 (NF-AT3) phosphoryliert und dessen Translokation in den Zellkern ermöglicht. Dort induziert NF-AT3 die Expression weiterer Transkriptionsfaktoren, welche über eine Größenzunahme der Kardiomyozyten und gesteigerte Proteinsynthese die kardiale Hypertrophie in Gang setzen (Molkentin et al. 1998).

Die kardiale Kontraktilität wird durch die bereits erwähnte nNOS moduliert (Ashley et al. 2002; Barouch et al. 2002), die zur Proteinfamilie der NO-Synthasen gehört und des Weiteren an der Aufrechterhaltung des Ca²⁺-Haushaltes (Khan und Hare 2003; Sears et al. 2003) und des Redoxgleichgewichtes (Hare und Stamler 2005) beteiligt ist. Wie Oceandy et al. zeigen konnten, wird die nNOS durch die Isoform 4b der PMCA reguliert,

was der Ca^{2+} -Pumpe eine größere Bedeutung für das Herz beimisst als zunächst vermutet wurde (Oceandy et al. 2007; Mohamed et al. 2011).

Die Datenlage ist jedoch uneindeutig:

Oceandy et al. zeigten anhand eines transgenen Mausmodells mit Überexpression der PMCA4b eine reduzierte Kontraktionsantwort bei β -adrenerger Stimulation sowie eine signifikante Reduktion des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers und eine signifikante Zunahme des Ratios Herzgewicht/Körpergewicht der Mäuse (Oceandy et al. 2007). Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass im Sarkolemm insuffizienter Herzen von Menschen und Ratten erhöhte Konzentrationen der nNOS detektiert werden konnten (Damy et al. 2004; Bendall et al. 2004), lassen eine Beteiligung der PMCA4b an der Entstehung von kardialer Hypertrophie und Remodelling vermuten.

Ein ähnliches Ergebnis hinsichtlich kardialer Kontraktilität erhielten Mohamed et al., die am Mausmodell die Auswirkungen eines PMCA4-Knockouts untersuchten und dabei eine Zunahme der myokardialen Kontraktilität detektieren konnten (Mohamed et al. 2011). Die eigentliche Funktion der PMCA - der Transport von Ca^{2+} aus den Kardiomyozyten in den Extrazellulärraum im Rahmen der Relaxation des Myokards - blieb entgegen der Erwartungen jedoch unbeeinflusst. Der zugrundeliegende Mechanismus liegt laut Mohamed et al. in der PMCA4-Knockout-vermittelten Delokalisation der nNOS von der Plasmamembran ins Zytosol der Kardiomyozyten, was über eine Erhöhung des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) zur Aktivierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen und Ryanodin-Rezeptoren führt und durch verstärkten Ca^{2+} -Einstrom in die Kardiomyozyten die Kontraktilität erhöht (Mohamed et al. 2011).

Wu et al. hingegen zeigten anhand ihres Mausmodells, dass eine Überexpression der PMCA4b die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie infolge Druckbelastung vermindern kann, ohne das Herz in einer anderen Art und Weise zu beeinträchtigen oder zu schädigen (Wu et al. 2009). Die Druckbelastung wurde dabei mittels Verengung der Aorta (*transverse aortic constriction*, TAC) simuliert. Auch die oft mit einer Hypertrophie einhergehende interstitielle Fibrose und ein in der Folge entstehendes Lungenödem wurden unter PMCA4b-Überexpression nicht beobachtet. Eine Ausschaltung (Knockout) des Gens führte unter gleichen Bedingungen bereits nach kurzer Dauer der Druckbelastung zu einer signifikanten Hypertrophie mit bald darauffolgender Dekompensation.

Angesichts dieser gegensätzlichen Ergebnisse bleibt die Bedeutung der PMCA4 uneindeutig, insbesondere auch im Hinblick auf das OSAS.

1.3.3 Herzinsuffizienz

Das OSAS geht mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz einher. Während den OSAS-Patienten im Rahmen der Sleep Heart Health Studie im Jahre 2001 ein im Vergleich zur Gesamtbevölkerung 2,4fach erhöhtes Risiko zugeschrieben wurde (Shahar et al. 2001), ist in jüngeren Studien von einem um bis zu 58% gesteigerten Risiko die Rede (Gottlieb et al. 2010). Tatsächlich betroffen sind schätzungsweise 11% der OSAS-Patienten, wobei umgekehrt in einem Drittel der Fälle bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz begleitend ein OSAS detektiert werden kann (Javaheri et al. 1998; Sin et al. 1999). Oftmals äußern die Betroffenen bereits vor Diagnosestellung der schlafbezogenen Atemstörung Symptome einer Herzinsuffizienz (Shahar et al. 2001) oder sind aufgrund dessen in ärztlicher Behandlung (Smith et al. 2002).

Eine Herzinsuffizienz ist laut der *World Health Organization* (WHO) definiert als Unfähigkeit des Herzens, die Organe in einem ausreichenden Maße mit Blut und somit auch Sauerstoff zu versorgen. Man unterscheidet dabei die systolische Herzinsuffizienz infolge verminderter Pumpfunktion von der diastolischen Herzinsuffizienz, welche durch eine herabgesetzte Dehnbarkeit der Ventrikel mit eingeschränktem Füllungsvermögen in der Diastole kennzeichnet ist (Herold 2015).

Beide Formen können im Rahmen der Schlafstörung auftreten (Shahar et al. 2001; Vitarelli et al. 2013), wobei korrelierend zur hohen Prävalenz von Hypertonie unter den OSAS-Patienten die linksventrikuläre diastolische Dysfunktion häufiger auftritt. Die Korrelation besteht unabhängig von anderen Einflussfaktoren und zeigt sich unter CPAP-Behandlung rückläufig (Arias et al. 2005; Pack und Gislason 2009). So konnte in einer Untersuchung von 150 neudiagnostizierten OSAS-Patienten bei 23% eine verminderte Dehnbarkeit des linken Ventrikels detektiert werden, wobei das Ausmaß der linksventrikulären diastolischen Dysfunktion von der Höhe des systolischen Blutdrucks und der Schwere des nächtlichen SpO₂-Abfalls abhängig war (Baguet et al. 2010). Auch Vitarelli et al. untersuchten kardiale Funktionsparameter von OSAS-Patienten in Abhängigkeit von deren AHI, wobei sich auch hier Hinweise für eine linksventrikuläre diastolische Dysfunktion zeigten, welche sich infolge CPAP-Therapie wieder verbesserte. Zur Evaluierung erhoben Vitarelli et al. die Torsion des linken Ventrikels (Vitarelli et al. 2013), welche die helikale Anordnung der Myokardfasern beschreibt und als wichtiger Faktor der normalen systolischen und diastolischen Funktion gilt. Myokardiale Schäden verändern diese Rotation, sodass in frühen Stadien einer diastolischen Dysfunktion häufig erhöhte Torsionswerte zu finden sind (Nakatani 2011; Milling 2013).

Die globale Funktion des Herzens kann anhand des Myocardial Performance Index (MPI) bestimmt werden, welcher echokardiographisch mittels Tissue-Doppler erhoben wird und sich aus der Summe der isovolumetrischen Kontraktionszeit (IVCT) und der isovolumetrischen Relaxationszeit (IVRT), dividiert durch die Ejektionszeit (ET) errechnet. Der MPI dient als Maß für die systolische und diastolische Funktion der Ventrikel, wobei die Höhe der Index-Werte mit dem Ausmaß der kardialen Dysfunktion korreliert (Tei et al. 1996; Dissertation Kraut 2014). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem schweren Schlafapnoe-Syndrom einen signifikant erhöhten MPI sowohl des rechten als auch des linken Ventrikels im Vergleich zu Patienten mit mildem OSAS aufweisen (Dursunoglu et al. 2005; Gao et al. 2009). Diese Verbindung bestand unabhängig von der Diagnose Hypertonie und ließ eine Korrelation mit dem AHI erkennen (Gao et al. 2009).

Hinsichtlich der molekularbiologischen Mechanismen, die an der Entwicklung der Herzinsuffizienz beteiligt sind, spielt die *suppressor of cytokine signaling* (SOCS)-Proteinfamilie eine zentrale Rolle. Die Proteine sind intrazellulär lokalisiert und besitzen eine SH₂-Domäne, mit welcher sie die Bindung an die jeweiligen Moleküle modulieren. In Bezug auf das Myokard sind insbesondere die Isoformen SOCS1 und 3 aufgrund ihrer Interaktion mit dem *Januskinase* (JAK)- *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT)-Signalweg von Bedeutung, dessen Aktivierung protektive Effekte auf das Herz ausübt. Über die SOCS-vermittelte Hemmung des JAK-STAT-Signalweges ist das Protein sowohl an der Entstehung von kardialer Hypertrophie als auch an inflammatorischen, apoptotischen und fibrotischen Prozessen beteiligt und trägt so zur Entwicklung von kardialem Remodelling nach Myokardinfarkt bei (Yasukawa et al. 2012; Carow und Rottenberg 2014). Aus diesem Grund wird SOCS nicht unter den jeweiligen Themengebieten aufgeführt, sondern zur Verdeutlichung der Zusammenhänge in diesem Kapitel dargelegt.

Der JAK-STAT-Signalweg wird durch Bindung verschiedener Zytokine, wie z.B. IL-6, IL-11, Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF), Leukämiehemmender Faktor (LIF) und Cardiotropin (CT)-1, aber auch durch EPO und SOCS3 aktiviert. Die Moleküle binden dabei an die JAK, eine Tyrosinkinase in der Zellmembran der Kardiomyozyten, welche daraufhin dimerisiert und durch Phosphorylierung die Bindung der STATs ermöglicht. Bei den STATs handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, welche, ebenfalls nach Phosphorylierung und Dimerisierung, in den Zellkern gelangen und dort die Transkription einer Vielzahl von für Zellproliferation, -differenzierung und -überleben zuständigen Genen induzieren. Die den JAK-STAT-Signalweg induzierenden Zytokine sind folglich essentiell für diese zellerhaltenden Prozesse, wobei die Hemmung dieses

Pfades durch SOCS3 im Umkehrschluss mit gesteigerter Inflammation und Apoptose einhergeht (Yasukawa et al. 2012; Carow und Rottenberg 2014).

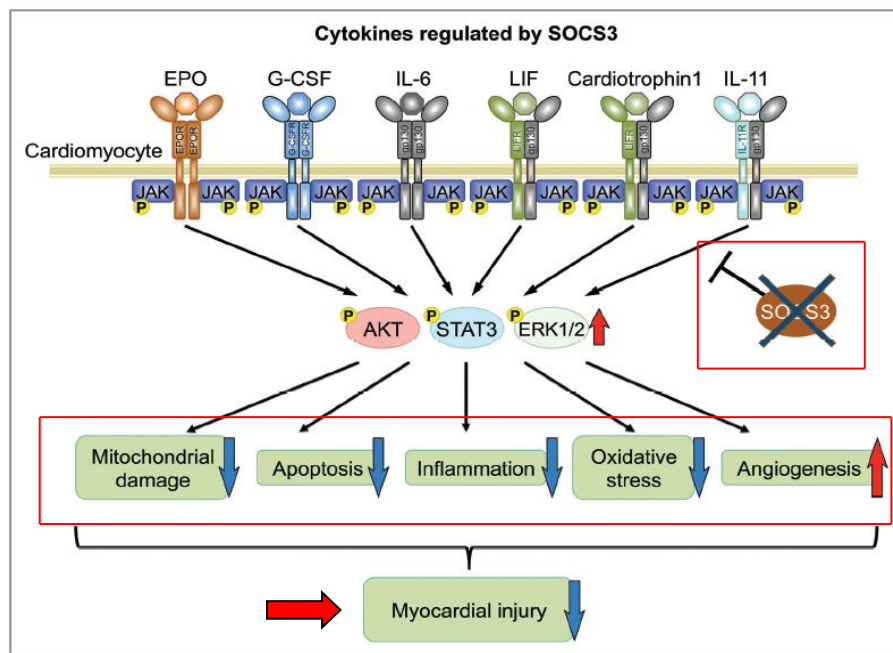


Abbildung 6: SOCS3-Knockout bei Myokardinfarkt

Ein SOCS3-Knockout führte im Mausmodell nach Myokardinfarkt zu einer Hochregulation kardioprotektiver Signalwege, was mit einer Verminderung von Inflammation, apoptotischen Vorgängen und Mitochondrienschäden einhergeht und die Kapillarneubildung begünstigt (Yasukawa et al. 2012, modifiziert).

Um die Rolle des Proteins weiter zu präzisieren, untersuchten Oba et al. anhand von SOCS3-Knockout-Mäusen die Auswirkungen einer SOCS3-Hemmung auf das Myokard nach akutem ischämischen Infarkt, welche in Abbildung 6 schematisch dargestellt sind (Oba et al. 2012). So zeigte sich, dass das SOCS3-Knockout eine Hochregulation des kardioprotektiven Signalwegs STAT3 zur Folge hat, wodurch die pathologischen Vorgänge des kardialen Remodellings reduziert, die Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie verhindert und apoptotische und inflammatorische Vorgänge vermindert werden konnten (Oba et al. 2012).

Weiterhin konnte im Rahmen des SOCS-Knockouts eine reduzierte Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien beobachtet werden (Oba et al. 2012), was einen Erklärungsansatz für den in Abbildung 6 beschriebenen verminderten Zelluntergang darstellt.

Mitochondrien sind der Hauptproduzent des zellulären Energielieferanten ATP und in Organen wie dem Herzen, der Niere und dem Gehirn in einer hohen Zahl zu finden. Neben ihrer Funktion als „Kraftwerke der Zelle“ sind sie allerdings auch an der Zellproliferation, der Apoptose, der Erhaltung der intrazellulären Calcium-Homöostase

sowie an der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt, sodass es infolge eines mitochondrialen Schadens oder einer Dysfunktion zur Beeinträchtigung der gesamten Zellfunktion kommt (Jakobs 2004; Eirin et al. 2014). Mitochondrien sind auch an den apoptotischen Signalwegen beteiligt, wobei es infolge eines apoptotischen Stimulus zur Permeabilitätssteigerung der mitochondrialen Membranen kommt. An diesem sogenannten mitochondrialen Permeabilitätsübergang (Mitochondrial Permeability Transition, MPT), welcher gekennzeichnet ist durch den Verlust des Transmembranpotentials, einer Schwellung der Matrix, der Hemmung der ATP-Produktion sowie der Freisetzung des mitochondrialen Elektronentransporters Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Zytosol, sind Proteine der inneren und äußeren Membran beteiligt. Diese Proteine formen einen Komplex (MPT-Pore), an welchem neben einem spannungsabhängigen Anionenkanal (Voltage Dependent Anion Channel, VDAC) auch die apoptotischen Moleküle Bcl-2 und Bcl-2 associated X protein (Bax) beteiligt sind. Der MPT führt, bedingt durch die Matrixschwellung, zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran, was aufgrund der damit einhergehenden Freisetzung von proapoptischen Molekülen (z.B. Cytochrom c und Procaspasen) aus dem Intermembranraum in das Zytosol in der Regel im programmierten Zelltod resultiert (Zoratti und Szabo 1995; Green und Reed 1998; Crompton 1999; Zamzami und Kroemer 2001; Wang et al. 2015).

Im Hinblick auf den programmierten Zelltod spielt somit nicht nur SOCS3 eine wichtige Rolle, sondern auch die Bcl-2-Proteinfamilie, zu welcher Apoptose inhibierende Moleküle (anti-apoptotisch, Bcl-2) und Apoptose fördernde (pro-apoptotisch, Bax) gehören. Das anti-apoptotische Bcl-2 ist ein integrales Membranprotein in der äußeren Mitochondrienmembran und entfaltet seine Wirkung durch Stabilisierung des Transmembranpotentials des Mitochondriums. Es wurde erstmals in Tumorzellen eines B-Zell-Lymphoms isoliert, was einerseits zur Namensgebung führte und andererseits die Bedeutung des Moleküls als Protoonkogen verdeutlicht, welches bei Überexpression durch Inhibition der Apoptose zur Entstehung von malignen Tumoren beitragen kann (Chao und Korsmeyer 1998; HUGO Gene Nomenclature Committee 2008).

Bax gehört zu den pro-apoptotischen Molekülen und vermittelt die Induktion der Apoptose durch Bindung an und Inhibierung von Bcl-2. Bax liegt frei im Zytosol der Zellen vor und wird durch einen apoptotischen Stimulus zur Bildung von Bax-Homodimeren angeregt. Infolgedessen kann das Protein ins Mitochondrium gelangen und dort die Freisetzung von Cytochrom c induzieren, wobei dies entweder über die Öffnung des VDAC oder über den Einbau einer Pore infolge Tetramerisierung geschieht (Desagher und Martinou 2000; Zamzami und Kroemer 2001). Die Expression von Bax wird durch den Tumorsuppressor p53 reguliert, welcher im Falle von DNA-Schäden

Reparaturmechanismen in Gang setzt, den Zellzyklus stoppt und mittels Bax-Aktivierung die Apoptose induziert (Gross et al. 1998; HUGO Gene Nomenclature Committee 2008). Der Transkriptionsfaktor p53 selbst hat vielfältige Einflüsse auf die mitochondriale Funktion. So kann er zum einen die Synthese des für die Atmungskette wichtigen Enzyms Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) induzieren, was zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Atmung beiträgt (Fields et al. 2007; Dai et al. 2016). Zum anderen erfolgt bei Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies und der damit einhergehenden Einschränkung der mitochondrialen Funktion die Translokation in den Zellkern zum Zweck der Expressionssteigerung von Miaap, das mittels Eliminierung von oxidierten Proteinen geschädigter Mitochondrien an deren Qualitätserhaltung beteiligt ist (Miyamoto et al. 2011). Bei irreversibler Schädigung kann p53 jedoch auch selbst die Apoptose des Mitochondriums durch Translokation in das Zellorganell herbeiführen (Qi et al. 2011; Dai et al. 2016).

Die molekularbiologischen Mechanismen, die im Rahmen des OSAS zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz führen, sind komplex und bedürfen weiterer Klärung, insbesondere im Hinblick auf die Bedeutung von SOCS3 und die zur mitochondrialen Dysfunktion führenden Prozesse.

1.4 Ziel der Arbeit

Das OSAS ist ein Krankheitsbild, dessen Prävalenz sich angesichts der steigenden Inzidenz des Hauptrisikofaktors Übergewicht/Adipositas vermutlich weiter erhöhen wird. Die Assoziation zu der Vielzahl an Begleiterkrankungen wie endothelialer Dysfunktion, arterieller Hypertonie und Insulinresistenz verdeutlicht die Bedeutung einer frühen Diagnosestellung und konsequenten Therapie der schlafbezogenen Atemstörung. Aufgrund klinischer Studien darf als gesichert gelten, dass der Hypoxie-Reoxygenierungs-Stress im Rahmen des OSAS über die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und ventrikulären Dysfunktion auch zu einer Herzinsuffizienz führen kann, wobei die zugrundeliegenden histomorphologischen und molekularbiologischen Veränderungen des Myokards bisher wenig untersucht wurden. Insbesondere fehlen systematische Untersuchungen an einem geeigneten Tiermodell des OSAS, welche im Rahmen dieses Projekts durchgeführt werden sollen.

In der vorliegenden Arbeit, welche einen Teilaspekt einer kooperativen Studie darstellt, werden anhand eines Mausmodells der CIH entsprechende linksventrikuläre Myokard-Veränderungen untersucht, die funktionelle Relevanz haben könnten.

Es kann vermutet werden, dass es infolge der Anpassungsmechanismen an chronische Hypoxie zu einer vermehrten Kapillarisation des Myokards kommt. Fraglich ist jedoch, ob es angesichts des Hypoxie-bedingten pro-inflammatorischen Milieus zur gesteigerten Perfusion kommt oder ob dies angesichts der endothelialen Dysfunktion zu einer Störung der Angiogenese führt. Wir untersuchten dazu die Expression angiogenetischer Faktoren (VEGF-A, VEGF-B, KDR, Notch1, Notch3) auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR im Vergleich zur histologisch detektierbaren Kapillardichte mittels Lektin-Färbung. Außerdem betrachteten wir im linksventrikulären Myokard die Expression inflammatorischer Marker (TNF- α , COX-2, IL-6 und IL-1 β) auf Gen-Ebene sowie deren Verteilungsmuster mittels immunhistochemischer Färbungen.

Zur Evaluierung, welche Mechanismen an der Entwicklung von kardialer Hypertrophie und ventrikulärer Dysfunktion beteiligt sind, analysierten wir zum einen die im Rahmen des OSAS bisher noch nicht untersuchten Ca²⁺-Transporters PMCA4 (als Faktor im den Hypertrophie-induzierenden Calcineurin/NFAT-Signalweg) sowie die Bedeutung apoptotischer Signale bezüglich möglicher Funktionseinbußen des Myokards anhand der genetischen Expression des anti-apoptotischen Faktors Bcl-2 und der pro-apoptotischen Faktoren Bax und Caspase 3. Die Bedeutung von CIH für die mitochondriale Integrität und die Rolle einer möglichen mitochondrialen Dysfunktion für

die entstehende Herzinsuffizienz bei OSAS-Patienten wurden bisher noch nicht untersucht und sollen im Rahmen dieses Projekts mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie erhoben werden.

Desweiteren untersuchten wir die Expression von SOCS3 als integralen Regulationsfaktor von inflammatorischen, apoptotischen und Hypertrophie-vermittelnden Prozessen bei myokardialen Veränderungen im Rahmen der Herzinsuffizienz.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav Heratherm Oven OMS 100	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Biofuge Fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Bunsenbrenner FIREBOY plus	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Chip Priming Station	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Elektronenmikroskop Zeiss EM 10 C	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Farbkamera AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen
KMR3 Glass Knifemaker	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
Kryostat Hyrax C 60	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Magnetrührer IKAMAG® RET-GS	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop Axio Imager. M2	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop BH-2	Olympus GmbH, Hamburg
MJ-Research PTC-200 Thermocycler	Global Medical Instrumentation Inc., Ramsey, USA
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop 2000C, UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pipetman Classic P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson Inc., Middleton, USA

Reichert Ultracut S Ultramikrotom	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany
Thermoshaker PHMT-PSC-15	Grant Instruments Ltd., Cambrigde, UK
Thermozykler Mx3005P QPCR Systems	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
TKA Gen Pure mit xCAD Dispenser	Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert
UV Sterilizing PCR Workstation	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vortexer MS 3	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Waage KB 3600-2N	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Wärmeschrank Hera Cell	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge Perfect Spin P	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Zentrifuge Pico 17	Heraeus Holding GmbH, Hanau

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte

2.1.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
10x Reaktionspuffer mit MgCl₂	Fisher Scientific, Schwerte
2,4,6-Tri-(dimethylaminomethyl)phenol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
2-Dodecenyl-Bernsteinsäureanhydrid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ampuwa, Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Blei(II)-nitrat	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze
Bovines Serumalbumin; Fraktion V	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Cacodilatpuffer	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
D-(+)-Galactose, ≥ 99 % (G0750)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
DePex Eindeckmittel Gurr®	VWR International Ltd., Poole UK

Destilliertes Wasser, DNase/RNase-frei	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Diaminobenzidin (DAB) Substrate	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Diaminobenzidin (DAB) Substrate Peroxide Buffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
di-Natriumtetraborat-Decahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
DNase I, RNase-frei	Thermo Scientific, Schwerte
dNTP Mix	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Dulbecco's PBS (1x) (without Ca & Mg)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Dulbecco's PBS (Powdered Buffer, without Ca & Mg)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Eosin G	Merck KGaA, Darmstadt
Epon C	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethanol $\geq 99,7$ %, unvergällt	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethanol 70 %	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol 96 %	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Flüssigstickstoff	Linde AG, München
Gelantine gepulvert	Merck KGaA, Darmstadt
Gelantinekapseln	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glutaraldehyd 25 % (wässrige Lösung)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol $\geq 99,7$ %	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaisers Glyceringelantine (Eindeckmittel)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchromsulfat	Merck KGaA, Darmstadt

Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Lectin von <i>Bandeiraea simplicifolia</i>, Biotin-konjugiert (L3759)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Methylnadicanhydrid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natronlauge (NaOH [1 mol/l])	Merck KGaA, Darmstadt
Oligo (dt)18-Primer	Fisher Scientific, Schwerte
Osmiumtetroxid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
peqGOLD TriFast	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pferdeserum (Donor Horse Serum)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Pikrinsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Propylenoxid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
QPCR Mouse Reference Total RNA (750600)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
RNase Away	Molecular BioProducts Inc., San Diego, USA
Salzsäure 1 mol/l	Merck KGaA, Darmstadt
Schweineserum (Porcine Serum)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Shandon Immu-Mount	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Tissue-Tek	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Uranylacetat-Dihydrat	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck KGaA, Darmstadt
Xylol (Isomere) >98 %, rein	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien

2.1.3 Materialien

Materialien	Hersteller
96-Loch-Platte	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Combitips plus, 0,5ml	Eppendorf AG, Hamburg
Deckgläser, 24 x 32mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Diamantmesser Ultra	Diatome AG, Biel, Schweiz
Disposable Microtome Blades SEC35e	Microm International GmbH, Walldorf
Einmalkanüle Sterican®, 21G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalskalpell	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Einmalspritze Omnifix® 40 Duo	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Glass strips 6.4 x 400 x 25mm	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
Microcentrifuge Tube w/ lid, 0,5 ml	BrandTech Scientific Inc., Essex, UK
Netzträger (Grids), 200 mesh	Plano GmbH, Wetzlar
Objektträger mit Mattrand	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Safe Seal Micro Tube, 1,5ml und 2ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Tube, 15ml und 50ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Verschlussstreifen für 96-Loch-Platte	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA

Tabelle 4: Liste der verwendeten Materialien

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Firma	Katalog-nummer
Anti-Cyclooxygenase 2	Polyklonaler Kaninchen anti-Cyclooxygenase 2 Antikörper	1:100	Abcam plc., Cambridge, UK	ab15191
Anti- TNF- alpha	Polyklonaler Maus anti- TNF-alpha Antikörper	1:100	Abcam plc., Cambridge, UK	ab6671
Anti- IL1 beta	Polyklonaler Maus anti IL1-beta Antikörper	1:100	Abcam plc., Cambridge, UK	ab9722
Anti- CD68	Monoklonaler Ratte anti-Maus CD 68 Antikörper	1:50	AbD Serotec, Kidlington, UK	MCA1957
Anti- Kaninchen IgG	Polyklonaler HRP-konjugierter Ziege anti- Kaninchen Antikörper	1:200	LINARIS Biologische Produkte GmbH, Dossenheim	ZRH1158
Anti-Ratte IgG	Polyklonaler HRP-konjugierter Ziege anti-Ratte Antikörper	1:200	AbD Serotec, Kidlington, UK	STAR72

Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper

2.1.5 Primer

Primer	Symbol	Amplikonlänge (bp)	Katalognummer
Actin beta	Actb	77	QT01136772
B cell leukemia/ lymphoma 2	BCL2	104	QT02392292
BCL2-associated X protein	Bax	78	QT00102536
Caspase 3	Casp3	150	QT01164779
CD36 antigen	CD36	149	QT01058253
CD68 antigen	CD68	67	QT00254051
F-box protein 32	Fbxo32	103	QT00158543
Interleukin 1 beta	Il1 β	150	QT01048355
Interleukin 6	Il6	128	QT00098875
Kinase insert domain protein receptor	Kdr	95	QT02519972
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	95	QT00247618
Notch gene homolog 1 (Drosophila)	Notch1	102	QT00156982
Notch gene homolog 3 (Drosophila)	Notch3	104	QT01051729
Plasma membrane Ca ²⁺ -ATPase 4a/b	PMCA4a/b	72	QT01563282
Plasma membrane Ca ²⁺ -ATPase 4b	PMCA4b	114	QT01076271
Prostaglandin- endoperoxide synthase 2	Ptgs2	95	QT00165347

Ribosomal protein L32	Rpl32	88	QT01752387
Suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	90	QT02488990
TATA box binding protein	Tbp	114	QT00198443
Tumor necrosis factor	Tnf- α	112	QT00104006
Vascular endothelial growth factor A	Vegfa	117	QT00160769
Vascular endothelial growth factor B	Vegfb	125	QT01059863

Tabelle 6: Liste der verwendeten Primer

2.1.6 Kits

Kit	Hersteller	Inhalt
Affinity Script Multiple Temperature Reverse Transcriptase	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA	AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase 10x AffinityScript RT Puffer 100 mM DTT
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA	Agilent RNA 6000 Nano Chips Elektronenreiniger Chips Agilent RNA 6000 Ladder RNA Nano Dye Konzentrat Agilent RNA 6000 Nano Marker Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix
Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA	2x Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix ROX Reference dye (1mM)
Diaminobenzidin (DAB, HRP-Substrat)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim	DAB/ metal concentrate (x10) Peroxid- Puffer

Tabelle 7: Liste der verwendeten Kits

2.1.7 Anwendungen/Software

Anwendung	Programm	Hersteller
Auswertung der Daten	Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen	Image J 1.45s Image SP Viewer	National Institutes of Health, USA TRS & SysProg, Minsk, Weißrussland
Auswertung der lichtmikroskopischen Aufnahmen	ZEN lite 2011	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Grafische Darstellung	Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Housekeeping Gene	NormFinder.xla	Molecular Diagnostics Laboratories, Convington, USA
Lichtmikroskopische Aufnahmen	AxioVision Release 4.8.2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Real Time PCR	MxPro QPCR Software	Agilent Technologies Inc., Santa Clara
Statische Auswertung	Sigma Plot 12.0	Systat Software Inc., Santa Clara, USA

Tabelle 8: Liste der Anwendungen

2.2 Methoden

2.2.1 Das Maus-Modell der chronisch-intermittierenden Hypoxie

Für dieses Projekt wurden männliche C57BL/6J-Mäuse der Firma Charles-River Deutschland GmbH (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere hatten ein durchschnittliches Gewicht von 20 - 30 Gramm und waren im Mittel 8 – 12 Wochen alt. Sie wurden im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen bei einer Raumtemperatur von 22 °C gehalten und von Tierpflegern mit Wasser und Futter versorgt (Dissertation Kraut 2014).

Zur Vergleichbarkeit erfolgte die Einteilung der Mäuse in eine Kontrollgruppe und eine Versuchsgruppe. Die Kontrollgruppe beinhaltete 10 Tiere, welche in einer Versuchskammer unter normoxischen Raumlufbedingungen (FiO_2 21%) gehalten wurden und nachfolgend als KON bezeichnet werden. Zur Simulation des Syndroms der obstruktiven Schlafapnoe wurden die 11 Tiere der Versuchsgruppe für sechs Wochen in einer Kammer gehalten, in die Computer-gesteuert Gasgemische ein- und ausgeleitet wurden. Um die OSAS-assoziierte CIH zu imitieren, erfolgte für acht Stunden pro Tag (fünf Tage pro Woche) ein minütlicher Wechsel des Gasgemisches von normoxischen Raumlufbedingungen (FiO_2 21%) zu hypoxischen Zuständen mit einer FiO_2 von 6 – 7%, was einem schweren OSAS bei einem AHI von 30 entspricht. Den Rest der Zeit wurden die Mäuse der Versuchsgruppe (nachfolgend als CIH bezeichnet) bei Raumlufbedingungen gehalten.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um einen Teilaspekt einer kooperativen Studie zwischen den Arbeitsgruppen um Prof. Dr. Norbert Weissmann (Institut für Schlafmedizin, Universität Gießen und Marburg; Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System, ECCPS, Deutsches Zentrum für Lungenforschung, Gießen) und Prof. Dr. Ralf Kinscherf. Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Norbert Weissmann, im Besonderen Frau Dr. Simone Kraut, führten zur Eruiierung der Pathogenese der OSAS-assoziierten Herzkreislauferkrankungen folgende Untersuchungen an den Tieren durch: Frau Dr. Simone Kraut setzte den Mäusen vor Versuchsbeginn einen Katheter in die rechte Femoralarterie zur Messung des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdrucks ein; die Messung erfolgte in den CIH-freien Zeitintervallen. Außerdem bestimmte sie mittels Echokardiographie zu Beginn und am Ende der Versuchszeit das Herzminutenvolumen, den Herzindex, verschiedene Parameter zur Erhebung der linksventrikulären Funktion sowie den Myocardial Performance Index (MPI, auch TEI Index) als Parameter zur Charakterisierung der globalen Herzfunktion. Diese von ihr gewonnenen Daten wurden in der Dissertation „Pathomechanismen der Schlafapnoe im Mausmodell - Rolle der endothelialen und induzierbaren NO-Synthase“ im Jahre 2014 publiziert (Dissertation Kraut 2014). Die hier

wiedergegebenen Daten sind somit Daten der kooperierenden AG um Prof. Dr. Weißmann, die dieses Mausmodell etabliert haben. Sie dienen als funktionelle Hintergrundinformationen zu den linksmyokardialen Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit und werden im Folgenden mit der Quellenangabe „Dissertation Kraut 2014“ kenntlich gemacht.

Die Myokardproben des CIH-Mausmodells und der KON-Kontrollmäuse wurden der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Kinscherf freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Weissmann zur Analyse des linksventrikulären Myokards überlassen.

Die Genehmigung der Tierversuche erfolgte durch das Regierungspräsidium Gießen und kann unter dem Aktenzeichen „GI 20/10 Nr. 84/2011“ eingesehen werden (Dissertation Kraut 2014).



Abbildung 7: Versuchskammer und CIH

Versuchskammer der Mäuse (links) und minütlicher Wechsel von 21% O₂ und 6-7% O₂ zur Imitation der CIH (rechts). Die CIH-Phase war bei den nachtaktiven Tieren tagsüber angesetzt, wie die dargestellte Uhrzeit belegt.

2.2.2 Materialgewinnung und Materialvorbereitung

Nach CIH-Exposition wurden die Tiere zur Gewährleistung weiterer Untersuchungen (Messung des pulmonalarteriellen Drucks, Blutentnahme zur Hämatokritmessung) und der anschließenden Gefäß- und Organentnahme heparinisiert und mit Ketaminhydrochlorid und Xylazin narkotisiert. Nach der Entnahme der Lunge erfolgte die Gefäßentnahme (A. carotis, Aorta, A. pulmonalis, A. femoralis, A. renalis) und im Anschluss die Entnahme des Herzens mit Trennung der Ventrikel und Gewichtsbestimmung. Ein Teil der Organe wurde für

molekularbiologische Untersuchungen auf Tissue-TEK gegeben, in Schraubdeckeltubes schockgefroren und anschließend bei -80° C gelagert, während das für histologische Untersuchungen vorgesehene Gewebe einer Formaldehyd-Fixierung mit nachfolgender Behandlung in Kochsalz- und Alkohollösungen unterzogen wurde (Dissertation Kraut 2014).

Zur Herstellung der Histologieschnitte des linken Myokards wurde ein Kryomikrotom verwendet, mit welchem bei -20 °C Schnitte mit einer Dicke von 6 – 8 µm aus den Tissue-TEK-Blöckchen angefertigt und anschließend auf Objektträger aufgenommen wurden. Die Objektträger mit jeweils drei Schnitten wurden im Folgenden bei -80 °C aufbewahrt, bis sie für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen verwendet wurden.

Um eine bessere Anhaftung der Kryoschnitte auf den Objektträgern zu erzielen, wurden diese vorab mit Chromalaun-Gelantine beschichtet.

Durchführung der Chromalaun-Gelatine Beschichtung:

Zur Herstellung der Chromalaun-Gelantine wird 1,0 g Gelatine und 0,1 g Kaliumchrom-III-Sulfat in jeweils 100 ml Aqua dest. gegeben und für 10 min auf 50 °C erhitzt. Die beiden Flüssigkeiten werden im Anschluss zusammengegeben und mithilfe des Magnetrührers für 10 min vermischt. Nachdem die Chromalaun-Gelantine abgekühlt ist, wird sie mittels Papiertüchern auf die Objektträger aufgetragen; überschüssiges Material kann mit einem weiteren sauberen Papiertuch entfernt werden. Die Objektträger werden nach Trocknung am folgenden Tag für die Materialgewinnung verwendet.

2.2.3 Färbungen

2.2.3.1 Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) zählt zu den Routinefärbungen (Welsch und Sobotta 2006) und wird insbesondere als Übersichtsfärbung vor immunhistochemischen Färbungen zur Detektion von pathologischen Veränderungen angewendet (Haggerty et al. 2014). Die gute Differenzierbarkeit der einzelnen Zell- und Gewebsstrukturen begründet sich in der unterschiedlichen Affinität zu den Farbstoffen: negativ geladene (anionische) Zellstrukturen wie beispielsweise die DNA lassen sich besonders gut durch das basische Hämatoxylin anfärben. Somit erscheinen Zellkerne und rER-reiche Zytoplasmaanteile blau-violett (basophil). Positiv geladene (kationische) Organellen nehmen hingegen verstärkt das saure Eosin auf, sodass sich Kollagen sowie Myofibrillen und Mitochondrien und

andere faserige extrazelluläre Komponenten rot (eosinophil) darstellen (Welsch und Sobotta 2006).

Durchführung der HE-Färbung:

Färbung:

1. Fixieren der Kryoschnitte in 4% PFA/PBS für 10 min
2. Inkubation in Häkalaun nach Mayer für 30 sek
3. Bläuen unter Leitungswasser für 10 min
4. Inkubation in Eosin für 3 min
5. Waschen in destilliertem Wasser für 1 min

Entwässerung:

1. Ethanol 96% für 5 min
2. Isopropanol für 2 x 5 min
3. Xylol I für 5 min
4. Xylol II für 5 min
5. Xylol III für 5 min

Im Anschluss an die Entwässerung wurden die Schnitte mit DePex Eindeckmittel und einem der Schnittgröße entsprechendem Deckglas eingedeckt.

2.2.3.2 Kapillarendothel-Färbung von Lectin mittels *Bandeiraea simplicifolia*

Mit der Lectin-Färbung können durch Anfärbung des Endothels die Kapillaren sichtbar gemacht werden.

Durchführung der Lectin-Färbung:

1. Fixieren der Kryoschnitte in 4% PFA/PBS für 10 min
2. Waschen in PBS für 3 x 5 min
3. Blocken mit 0,05% H₂O₂/PBS für 15 min
4. Waschen in PBS 2 x 5 min
5. Auftragen von Lectin *Bandeiraea simplicifolia* 1:50 (40 µg/ml 0,01% Triton/PBS) und Inkubation bei 37 °C für 60 min
6. Waschen in PBS 3 x 5 min
7. Auftragen von DAB (1:10 in Puffer verdünnt) für 5 min
8. Waschen in PBS 2 x 5 min
9. Häkalaunbad nach Mayer für 30 sek

10. Bläuen unter Leitungswasser für 10 min
11. Entwässerungsreihe (s. Hämatoxylin-Eosin-Färbung)
12. Eindecken mit DePex und einem der Organgröße entsprechendem Deckglas

Nach der vollständigen Aushärtung des Eindeckmittels über Nacht wurden mit dem Mikroskop Axio Imager M2 lichtmikroskopische Aufnahmen der Schnitte in 200- und 400-facher Vergrößerung angefertigt. In jeder der beiden Vergrößerungen wurden pro Maus fünf Fotos von querangeschnittenen Herzmuskelfasern gemacht, von denen jeweils drei Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung zur Auswertung mit dem Programm ZEN lite 2011 der Carl Zeiss AG ausgewählt wurden. Dabei erfolgte zunächst die Auszählung aller DAB-positiv angefärbten Kapillaren des gesamten Bildausschnittes des Myokard-Querschnittes (entsprechend einer Größe von $153.334 \mu\text{m}^2$ bzw. $0,153 \text{ mm}^2$). Die Anzahl der Kapillaren der drei jeweiligen Bilder pro Maus wurde anschließend arithmetisch gemittelt. Auf diese Weise konnte die Kapillardichte (Kapillaranzahl pro Fläche) für jedes Tier ermittelt werden. Zur statistischen Auswertung diente das Programm Sigma Plot 12.0, die grafischen Darstellungen wurden mit Excel angefertigt (siehe auch Tabelle 8: Liste der Anwendungen).

2.2.3.3 Immunhistochemische Färbungen

Bei der Immunhistochemie können Zell- oder Gewebebestandteile mittels an Antikörper gekoppelten Farbstoffen sichtbar gemacht werden (Lang 2013). Dazu werden die auf den Objektträgern befindlichen Kryoschnitte zunächst fixiert und gewaschen, anschließend wird der Primärantikörper auf das Gewebe aufgetragen. Dieser Primärantikörper wird vom Zweitantikörper detektiert, sodass der Antigen-Antikörperkomplex über die Zugabe von Diaminobenzidin (DAB), wodurch ein brauner Farbstoff entsteht, lichtmikroskopisch erkennbar gemacht werden kann (Lang 2013).

Eine Übersicht über die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper gibt Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper.

Durchführung der Immunhistochemie:

Tag 1:

1. Fixierung der Kryoschnitte in 4% PFA/PBS für 10 min
2. Waschen in PBS für 3 x 5 min
3. Blocken in 1% NSS/PBS bei 37 °C für 30 min
4. Absaugen des 1% NSS/PBS
5. Auftragen des jeweiligen 1. Antikörpers (bzw. PBS auf die Schnitte der Negativkontrolle) und Inkubation über Nacht bei 4-6 °C

Tag 2:

1. Waschen der Kryoschnitte in PBS für 3 x 5 min
2. Blocken der endogenen Peroxidase mit 3% H₂O₂/PBS für 5 min
3. Waschen in PBS für 3 x 5 min
4. Auftragen des jeweiligen 2. Antikörpers und Inkubation für 50 min bei Raumtemperatur
5. Waschen in PBS für 3 x 5 min
6. Auftragen von DAB für 5 min bzw. entsprechend der Braunfärbung
7. Waschen in PBS für 2 x 5 min
8. Häkalaunbad nach Mayer für 30 sek
9. Bläuen unter Leitungswasser für 10 min
10. Entwässerungsreihe (s. Hämatoxylin-Eosin-Färbung)
11. Eindecken der Objektträgern mit DePex und einem der Organgröße entsprechendem Deckglas

Bei jedem Färbe-Durchgang erfolgte die Durchführung einer Negativkontrolle, bei welcher anstelle des Primärantikörpers PBS-Puffer auf das Gewebe aufgetragen wurde.

Auch bei dieser Methode erfolgte im Anschluss an die Aushärtung des Eindeckmittels die Anfertigung lichtmikroskopischer Aufnahmen der Schnitte in 100-, 200- sowie 400facher Vergrößerung. Im Gegensatz zur Lectin-Färbung wurden bei den immunhistochemischen Färbungen pro Maus jeweils fünf Fotos von quer sowie längs angeschnittenem Herzmuskel angefertigt. Jeweils drei Bilder in 200facher Vergrößerung dienten im Anschluss der Auswertung.

Analog zur Lectin-Färbung erfolgte auch bei allen immunhistochemischen Färbungen die Auswertung mit dem Programm ZEN lite 2011 der Carl Zeiss AG, die statistische Datenverarbeitung mit Sigma Plot 12.0 und die grafische Darstellung mit Excel (siehe Tabelle 8: Liste der Anwendungen). Nach Quantifizierung aller Zellkerne des gesamten Bildausschnittes (ebenfalls einer Größe von 153.334 µm² bzw. 0,153 mm² entsprechend) wurde sowohl die Anzahl DAB-positiv gefärbter Zellen als auch deren prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl bestimmt. Um einen repräsentativen Wert für jede Maus zu erhalten, wurden jeweils drei Bilder (quer und längs angeschnittenes Myokard) ausgewertet und das arithmetischen Mittel gebildet.

2.2.4 Molekularbiologische Analyse der Herzmuskelbiopsien mittels qRT-PCR

2.2.4.1 Vorbereitung des Gewebes

Die Vorbereitung des Gewebes erfolgte nach gründlicher Desinfektion aller Arbeitsflächen mit 70% Ethanol unter eingeschaltetem Abzug. Um eine Erwärmung der zuvor bei -80°C gelagerten Herzmuskelbiopsien zu verhindern, wurde auf Trockeneis gearbeitet und die verwendeten Utensilien mit Flüssigstickstoff abgekühlt. Mithilfe von sterilen Stößeln und Mörsern erfolgte die Zerkleinerung des Gewebes bis zu einer pulverförmigen Konsistenz mit anschließender Überführung in ein steriles und gekühltes Cup. Da die Proben bereits für die immunhistochemische Materialgewinnung verwendet wurden, war die gewonnene Materialmenge relativ gering, sodass für die qRT-PCR eine Poolung des Herzmuskelgewebes von jeweils fünf Tieren pro Gruppe erfolgte.

2.2.4.2 Extraktion der RNA

Zunächst wurde das Gewebe mit peqGOLD TriFast homogenisiert und im Anschluss für fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach erfolgte die Hinzugabe von Chloroform (200 μl pro ml TriFast) mit anschließendem kräftigen Schütteln der Probe für 15 Sekunden und erneutem Stehenlassen für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Mittels Zentrifugation für fünf Minuten bei $12.000 \times g$ konnte im Folgenden eine Bildung von drei Phasen herbeigeführt werden, wobei die oberste, RNA-enhaltende Phase in ein neues Cup überführt wurde. Nach Zugabe von Isopropanol zur Präzipitation der RNA und gutem Mischen der Probe erfolgte die Inkubation auf Eis für 15 Minuten. Nach erneutem Zentrifugieren der Probe bei $12.000 \times g$ und 4°C für 30 Minuten wurde der Isopropanolüberstand abpipettiert und das entstandene RNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und kurz gevortext. Um auch den 70% Ethanol-Überstand abpipettieren zu können, erfolgte eine weitere Zentrifugation bei $12.000 \times g$ und 4°C für 10 Minuten. Das Pellett trocknete im Anschluss an der Luft, bevor es in 25 μl RNase- und DNase-freiem Wasser gelöst und zum besseren Lösen der RNA für 10 Minuten bei 60°C im Thermoshaker PHMT-PCS-15 inkubiert wurde.

Zur Ermittlung der Integrität der RNA dienten der Bioanalyzer 2100 und der Agilent RNA 6000 Nano Kit. Als Maß wurde dabei die RIN (RNA Integrity Number) herangezogen: bei völlig intakter RNA liegt der Wert bei 10, bei stark geschädigter RNA kann der Wert bis auf 1 absinken (Schroeder et al. 2006). Die RIN Werte der in dieser Arbeit untersuchten gepoolten Proben lagen bei 6,80 (KON) und 7,10 (CIH).

2.2.4.3 DNase-Verdau

Um eine Kontamination der RNA durch genomische DNA zu verhindern, wurde vor der Reversen Transkriptase-Reaktion ein DNase-Verdau durchgeführt. Nach langsamem Auftauen auf Eis wurde dazu die RNA-Probe (1 µg RNA) zunächst mit destilliertem RNase- und DNase-freiem Wasser auf 7,5 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Es erfolgte die Zugabe von 1 µl Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, pH 7,5) sowie 1,5 µl DNase I und die anschließende Inkubation im MJ Research PTC-200 Thermocycler bei 37 °C für 30 Minuten. Nach Abschluss dieses Schrittes wurde 1 µl 50 mM EDTA hinzugefügt und erneut bei 65 °C für 10 Minuten inkubiert. Die Abkühlung der Probe erfolgte auf Eis, die weitere Lagerung bei -80 °C.

2.2.4.4 c-DNA-Synthese

Die RNA konnte in der Reversen Transkriptase-Reaktion mithilfe eines Primers und dem Enzym Reverse Transkriptase zu cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurde die RNA wie üblich langsam auf Eis aufgetaut, 1 µl Oligo (dT)₁₈ Primer (0,5 µg/µl) hinzugegeben und die Probe anschließend mit RNase- und DNase-freiem destillierten Wasser auf 13,7 µl aufgefüllt. Nach der Inkubation bei 65 °C für 5 Minuten erfolgte die Lagerung der Cups bei Raumtemperatur für 10 Minuten, bevor im Anschluss folgende Substanzen hinzugegeben wurden: 2 µl 10x AffinityScript RT-Puffer (500 mM Tris-HCL, pH 8,3, 750 mM KCL, 30 mM MgCl₂), 2 µl DTT (100mM), 0,8 µl dNTP-Mix (100mM), 1 µl AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase, 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl). Es entstand eine Lösung mit einem Endvolumen von 20 µl, welche für eine Stunde bei 42 °C im MJ Research PTC-200 Thermocycler inkubiert und im Anschluss für 15 Minuten auf 70 °C erhitzt wurde.

2.2.4.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Mithilfe von spezifischen Primern und der Taq-DNA-Polymerase können bestimmte Sequenzen der cDNA amplifiziert werden. Zur Detektion der DNA dient ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher die doppelsträngige DNA interkaliert. Dazu ist allerdings eine bestimmte Signalstärke nötig, um die Hintergrundfluoreszenz zu überdecken. Je größer die Anzahl an DNA-Kopien zu Beginn der Reaktion ist, umso weniger Zyklen sind nötig, um diese Schwelle zu erreichen (Higuchi et al. 1993). Der Zyklus, bei dem die Schwelle überschritten wird, nennt sich threshold cycle (Ct).

In Vorbereitung auf die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde die cDNA-Lösung zunächst mit RNase- und DNase-freiem Wasser im Verhältnis von 1:10 verdünnt. Die Proben der Standardkurve, für welche in Abhängigkeit vom jeweiligen Primer cDNA einer

Mäuse-Referenz-RNA oder ein cDNA-Mix diente, wurden ebenfalls mit destilliertem RNase- und DNase-freiem Wasser auf 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 und 1:320 verdünnt. Weiterhin wurde im Voraus der PCR 6 µl des 1:100 verdünnten ROX Reference dye zum 2x Brilliant III Ultra-Fast SYBR®Green QPCR Master Mix hinzugegeben sowie die SYBR®Green-QPCR-Lösung angesetzt. Letzteres erfolgte durch Zugabe von 7,5 µl des angesetzten 2x Brilliant III Ultra-Fast SYBR®Green QPCR Master Mix (enthält Taq-DNA-Polymerase, dNTPs, Mg^{2+} , einen Puffer und einen in die doppelsträngige DNA-bindenden fluoreszierenden Farbstoff SYBR Green I) zu 1 µl destilliertem RNase- und DNase-freiem Wasser und 1,5 µl Primer. Von dieser Lösung wurden 10 µl pro Well benötigt.

Die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion erfolgte an der UV Sterilizing PCR Workstation. Es wurden zunächst jeweils 5 µl cDNA-Probe (im Pipettierschema weiß unterlegt) und Standard (im Pipettierschema hellgrau unterlegt) als Doppelbestimmung auf eine 96-Loch-Platte pipettiert. Als Negativkontrolle diente RNase- und DNase-freies Wasser, welches anstelle von cDNA in ein freies Well pipettiert wurde (NAC). Anschließend erfolgte das Pipettieren von jeweils 10 µl SYBR®Green-QPCR-Lösung in jedes verwendete Well.

Nach Beendigung dieses Schrittes wurde die Platte mit Verschlussstreifen verschlossen und für eine Minute in der Zentrifuge Perfect Spin P zentrifugiert. Nachdem die Platte in den PCR-Block Mx3005P QPCR Systems gestellt wurde, konnte die Amplifizierung gestartet werden. Dies geschah mithilfe des Programms MxPro QPCR Software nach folgendem Thermal-Profil:

<u>Zyklen</u>	<u>Dauer des Zyklus</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Vorgang</u>
1	3 Minuten	95 °C	Initiale Denaturierung
40	10 Sekunden	95 °C	Denaturierung
	20 Sekunden	60 °C	Elongation
1	1 Minute	95 °C	Schmelkurvenanalyse
	30 Sekunden	55 °C	
	je 30 Sekunden	jeweils + 1 °C bis	

zum Erreichen von

95 °C

Nach Ablauf des eigentlichen Amplifizierungsprogramms erfolgte die in der Tabelle aufgeführte Schmelzkurvenanalyse. Die Proben wurden ausgehend von 55 °C alle 30 Sekunden um 1 °C erhitzt, bis eine Temperatur von 95 °C erreicht wird. Dabei kam es zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge in zwei Einzelstränge und somit zur Freisetzung des zuvor interkalierten Fluoreszenzfarbstoffs SYBR® Green I. Die dadurch entstandene Änderung der Fluoreszenz wurde registriert. Anhand des höheren Schmelzpunktes können spezifische PCR-Produkte von unspezifischen Primerdimeren unterschieden werden.

Mithilfe der Standardkurvenmethode erfolgte nun die relative Quantifizierung der Daten. Dabei diente für jedes zu untersuchende Genprodukt ein cDNA-Mix einer Mäuse-Referenz-DNA oder der zu untersuchenden Proben zur Erstellung einer Standardkurve, welche mittels linearer Regression Rückschlüsse auf die jeweiligen cDNA-Konzentrationen der zu untersuchenden Proben erlauben.

Um eine Normalisierung der cDNA zu ermöglichen, wurde die Expression der jeweiligen DNA auf ein ausgewähltes house-keeping Gen bezogen. Diese Auswahl erfolgte unter Zuhilfenahme des Programm Normfinder.xla aus verschiedenen zuvor getesteten Genen (Rpl32, RRLP0, Actb, Tbp) und war in diesem Fall das house-keeping Gen Tbp.

2.2.5 Transmissionselektronenmikroskopie

2.2.5.1 Allgemeines

Während mit der Lichtmikroskopie eine Auflösung von ca. 200 nm möglich ist, erlaubt die Elektronenmikroskopie eine hochpräzise Darstellung von Gewebsoberflächen mit einer bis zu 500.000-fachen Vergrößerung und einem Auflösungsvermögen bis 0,1 nm. Dies geschieht unter Verwendung eines Elektronenstrahls, mit welchem ein Durchlicht-Elektronenbild erzeugt werden kann (Goodhew et al. 1991). Da bei der hier angewandten Transmissions-Elektronenmikroskopie das Gewebe von Elektronen durchstrahlt wird, muss es besonders dünn sein (sogenannte Ultradünnschnitte). Aufgrund der hohen Auflösung eignet sich das Verfahren somit gut zur Betrachtung der Organellen der Herzmuskelzelle, insbesondere der Mitochondrien.

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden aus Kontroll- und Versuchsgruppe jeweils fünf Mäuse ausgewählt, deren Proben wie im Folgenden bearbeitet wurden.

2.2.5.2 Einbettung der Muskelproben

Zunächst erfolgte eine Immersionsfixation der Proben, wozu die Fixierlösung nach Ito verwendet wurde. Diese setzt sich wie folgt zusammen:

<u>Fixierlösung nach Ito:</u>	2,5% Paraformaldehyd
	2,5% Glutaraldehyd
	0,05% Pikrinsäure
	0,1 m Cacodilatpuffer pH 7,3

Die Proben wurden in dieser Lösung bei einer Temperatur von 4 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Nach der Fixierung der linksventrikulären Myokardproben erfolgte die dreimalige Spülung in 0,1 m Cacodilatpuffer (3 x 5 Minuten) mit anschließender Osmierung für 60 Minuten in einer Lösung, bestehend aus 3% Kaliumferrocyanat und 2% wässrigem OsO₄ (vor Gebrauch aus gleichen Teilen anzusetzen). Auch nach diesem Vorgang schloss sich das Spülen der Proben in 0,1 m Cacodilatpuffer an, bevor die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe (aus unvergälltem Ethanol) entwässert wurden:

50% - 70% - 90% - 96%	für jeweils 5 min
100%	für 4 x 15 min

Danach erfolgte die Infiltration nach folgendem Schema:

Propylenoxid	für 2 x 10 min
Propylenoxid/Epon C 1:1	über Nacht
Epon C	über Nacht

Im Anschluss an diesen Schritt konnte die Einbettung der Proben mit Epon C in nummerierte Gelatine kapseln sowie die Polymerisation bei 60 °C für 12 Stunden zur Aushärtung durchgeführt werden.

Die Arbeitsschritte wurden mit Schutzkleidung und unter eingeschaltetem Abzug durchgeführt; die Reinigung der Arbeitsflächen erfolgte mit Methanol und Seifenlösung.

2.2.5.3 Anfertigung der Ultradünnschnitte, Kontrastierung und Aufnahme der Bilder

Um die korrekte Ausrichtung und Lage der Muskelproben zu überprüfen, wurden mithilfe eines Reichert Ultracut S Ultramikrotoms Semidünnschnitte mit einer Dicke von 1µm angefertigt, mit Semidünnschnitt-Farblösung angefärbt und unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Zur Herstellung dieser Schnitte dienten Glassmesser aus Glass strips, welche mit dem KMR3 Glass Knifemaker gefertigt wurden.

Die für die Transmissionselektronenmikroskopie verwendeten Ultradünnschnitte wurden mittels Ultramikrotom und Diamantmesser angefertigt und hatten eine Dicke von ca. 50nm. Sie wurden auf Netzträger aufgezogen und zur Kontrastierung für 15 Minuten in einen Tropfen Uranylacetat 4% gesetzt. Nach dreimaligem Waschen der Netzchen in Aqua dest. erfolgte das Eintauchen in einen Tropfen Bleicitrat nach Reynolds für zehn Minuten mit anschließender dreimaliger Spülung in destilliertem Wasser. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten nun mit dem Elektronenmikroskop Zeiss EM 10 C angefertigt werden. Es wurde eine Vergrößerung von 5.000- und 16.000fach gewählt.

2.2.5.4 Auswertung der Bilder

Zur Auswertung wurden pro Maus per Zufallsprinzip jeweils drei Bilder des linksventrikulären Myokards in 16.000facher Vergrößerung ausgewählt und mit den Programmen Image J und Image SP Viewer hinsichtlich folgender Kriterien untersucht:

- Anzahl der Mitochondrien pro Aufnahme
- minimale, maximale und durchschnittliche Größe (Fläche) der Mitochondrien sowie deren Anteil an der Gesamtfläche der Aufnahme
- Integrität (Qualität) der Mitochondrien

Um repräsentative Werte für die einzelnen Tiere zu erhalten, wurde aus den jeweiligen Ergebnissen der drei Aufnahmen der Mittelwert gebildet. Jedes Bild zeigt eine Fläche von 40 µm², sodass pro Maus 120 µm² Herzmuskel untersucht wurde.

Bei der Untersuchung der Integrität wurde das Augenmerk auf die Qualität der mitochondrialen Ultrastruktur gelegt und vornehmlich die äußere Doppelmembran und die Cristae der Mitochondrien betrachtet, da diese beiden Komponenten laut Literatur für die

Funktion dieses Zellorganells maßgeblich sind: “Damaged mitochondria were defined by loss of electron density in more than 20% of the area of a mitochondrion. Autophagosomes or autolysosomes were identified by the characteristic structure of a double or multi-lamellar smooth membrane completely surrounding compressed mitochondria or membrane bound electron-dense material” (Dai et al. 2011).

Auswertungskriterien:

Als intakt wurde ein Mitochondrium gewertet, wenn

a) sowohl Cristae als auch die äußere Doppelmembran vollständig intakt sind.

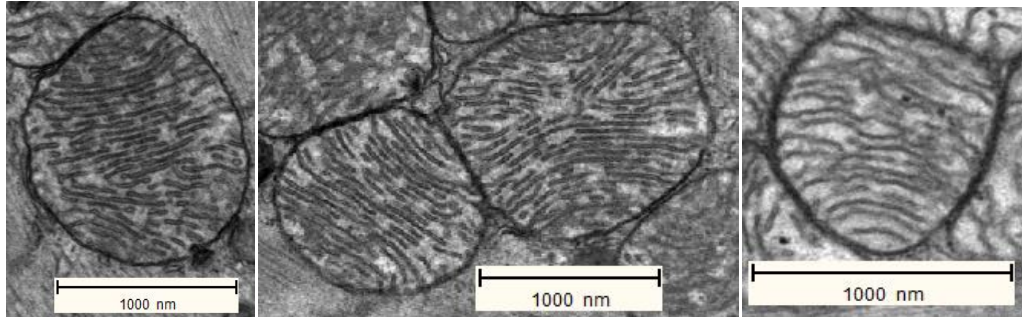


Abbildung 8: Beispiele für Mitochondrien mit vollständig intakter äußerer Doppelmembran und vollständig intakten Cristae

b) die Cristae zu > 50% erhalten sind und die Doppelmembran vollständig intakt ist.

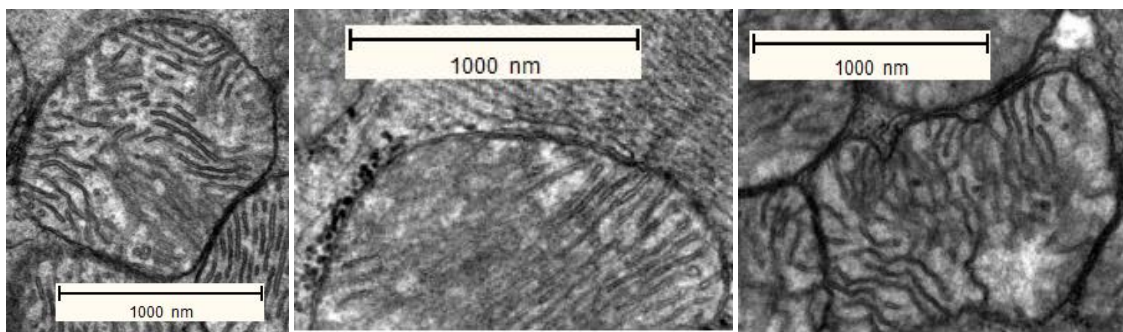


Abbildung 9: Beispiele für Mitochondrien, deren Cristae zu >50% erhalten sind und deren äußere Doppelmembran vollständig intakt ist

c) die Cristae vollständig intakt sind und die Doppelmembran zu >50% erhalten ist.

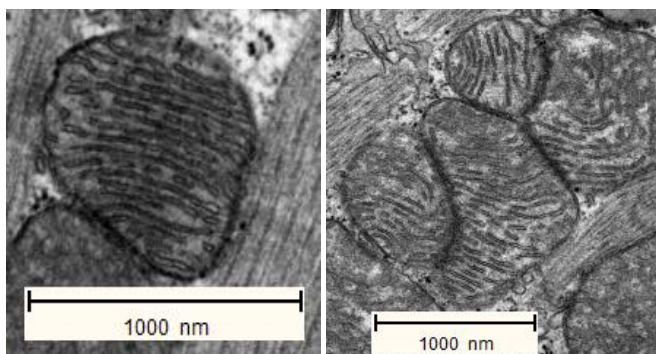


Abbildung 10: Beispiele für Mitochondrien, deren Cristae vollständig intakt sind und deren äußere Doppelmembran zu >50% erhalten ist

d) sowohl Cristae als auch äußere Doppelmembran zu >50% erhalten sind

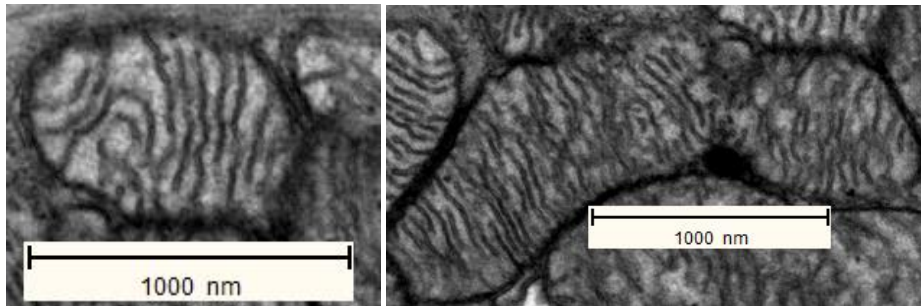


Abbildung 11: Beispiele für Mitochondrien, deren Cristae und äußere Doppelmembran zu >50% erhalten sind

Als defekt wurden Mitochondrien gewertet, wenn

a) die äußere Doppelmembran zwar erhalten, die Cristae aber >50% zerstört sind.

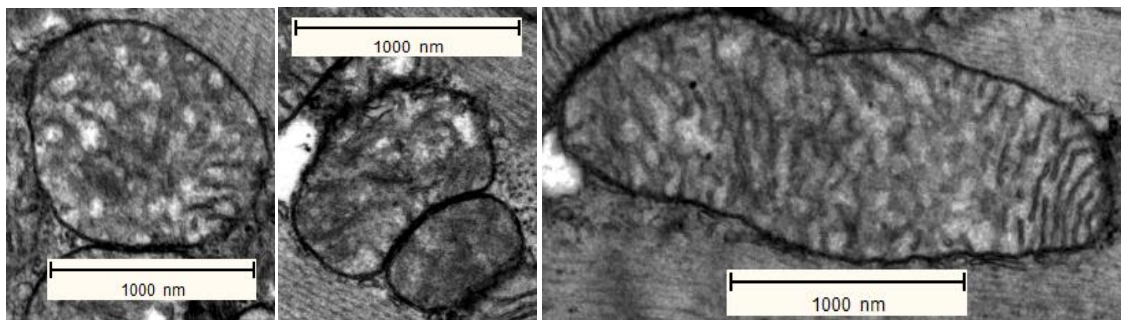


Abbildung 12: Beispiele für Mitochondrien, deren äußere Doppelmembran zwar erhalten, aber deren Cristae vollständig zerstört sind

b) die Cristae zwar erhalten sind, die äußere Doppelmembran aber >50% zerstört ist.

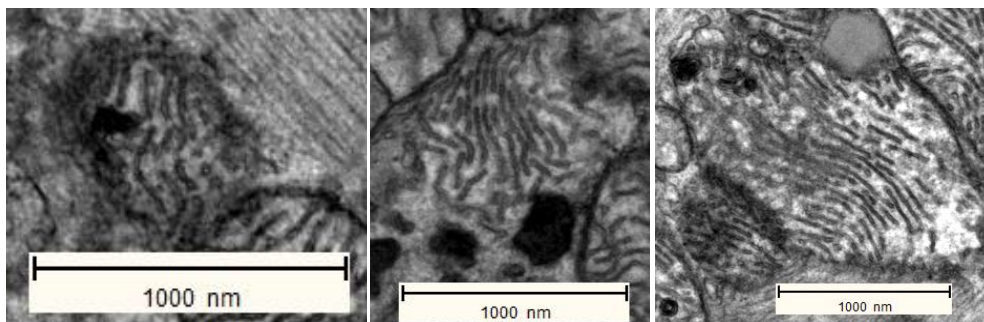


Abbildung 13: Beispiele für Mitochondrien, deren Cristae zwar erhalten sind, aber deren äußere Doppelmembran vollständig zerstört ist

c) sowohl Cristae als auch äußere Doppelmembran zu > 50% zerstört sind.

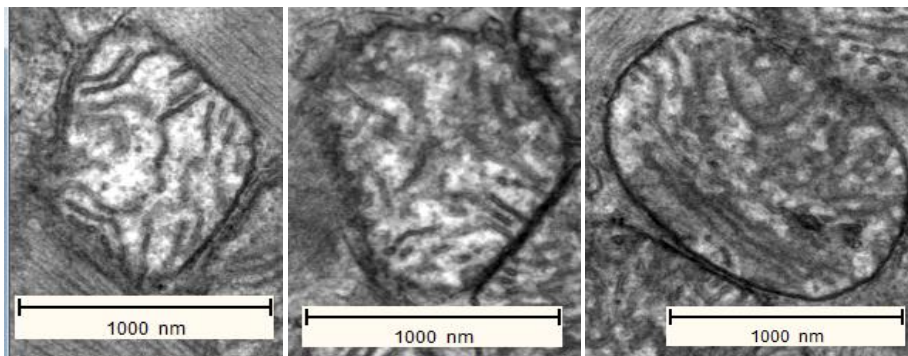


Abbildung 14: Beispiele für Mitochondrien, deren Cristae und äußere Doppelmembran zu >50% zerstört sind

d) sowohl Cristae als auch äußere Doppelmembran vollständig zerstört sind.

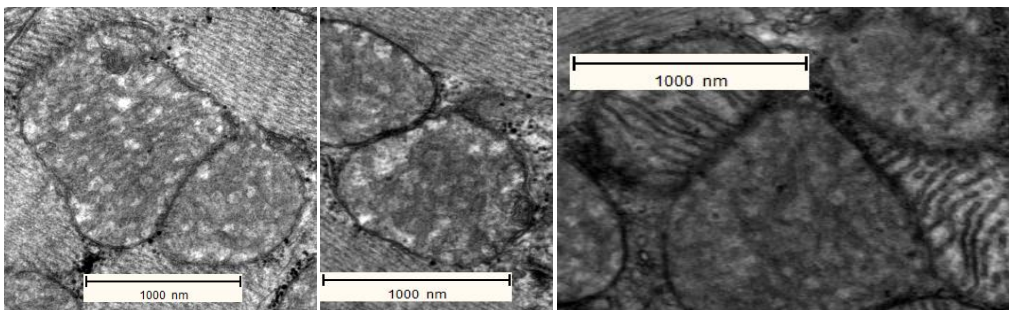


Abbildung 15: Beispiele für Mitochondrien, deren Cristae und äußere Doppelmembran vollständig zerstört sind

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkungen von CIH auf Kapillarisation und Angiogenese-Marker

3.1.1 Histochemische Untersuchung der Kapillardichte

Zur Untersuchung der Kapillarisation (Kapillaren mit einem Durchmesser $<7,5 \mu\text{m}^2$) des linksventrikulären Myokards wurde die Lektin-Färbung durchgeführt. Dabei wurde vorgegangen wie unter Punkt 2.2.3.2 bereits beschrieben. In der KON-Gruppe konnten durchschnittlich $500,7 \pm 16,14$ (Mittelwert \pm SEM) Kapillaren pro Aufnahme (entsprechend einer Fläche von $153.334 \mu\text{m}^2$) gezählt werden, was hochgerechnet auf 1mm^2 im Mittel $3265 \pm 105,30$ (Mittelwert \pm SEM) Kapillaren/ mm^2 ergibt. In der CIH-Gruppe waren es durchschnittlich $530,8 \pm 17,68$ (Mittelwert \pm SEM) Kapillaren pro Aufnahme, was zu einer Kapillaranzahl von $3530 \pm 114,46$ (Mittelwert \pm SEM) Kapillaren/ mm^2 führt. Wie in Abbildung 16 dargestellt, kann beim Vergleich von NOX und CIH kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der myokardialen Kapillardichte festgestellt werden ($p=0.228$). Die nicht signifikante prozentuale Zunahme der Kapillaren in der CIH-Gruppe beträgt 6%.

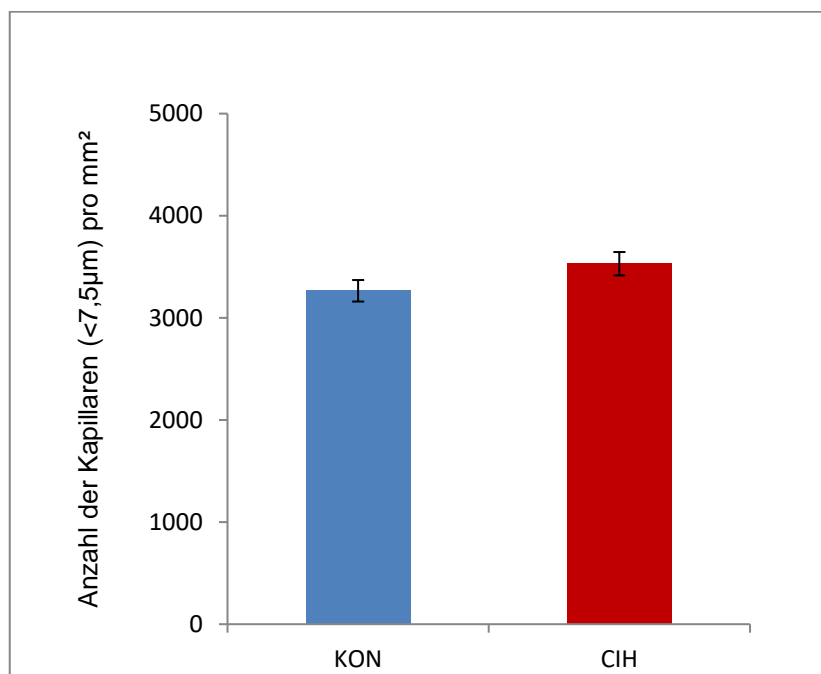


Abbildung 16: Anzahl der Kapillaren pro mm^2 linksventrikulärem Myokard

KON = Kontrollgruppe, CIH = Versuchsgruppe

Gezeigt sind Mittelwert \pm SEM; $n=11/10$, $p=0.228$

Die Abbildungen 17 und 18 zeigen Beispiele des quer angeschnittenen linksventrikulären Myokards nach Lectin-Färbung in 200-facher Vergrößerung. Die Zellkerne des Myokards sind infolge der Hämatoxylin-Färbung blau gefärbt, die DAB-positiv gefärbten Kapillaren und deren Zellkerne zeigen eine braune Färbung.

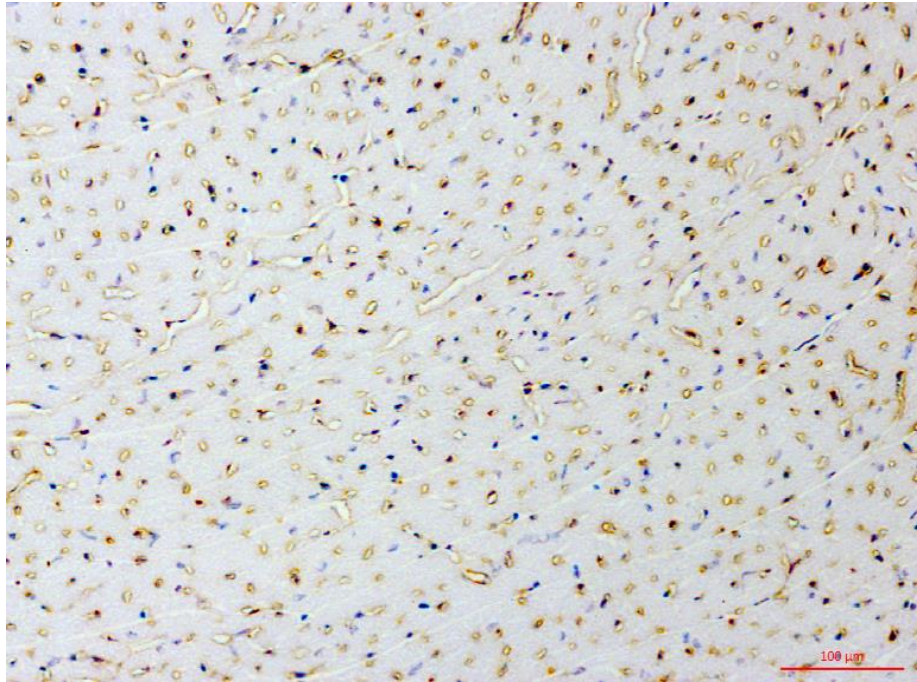


Abbildung 17: Lectin-Färbung, KON

Linksventrikuläres Myokard im Querschnitt, 200-fache Vergrößerung

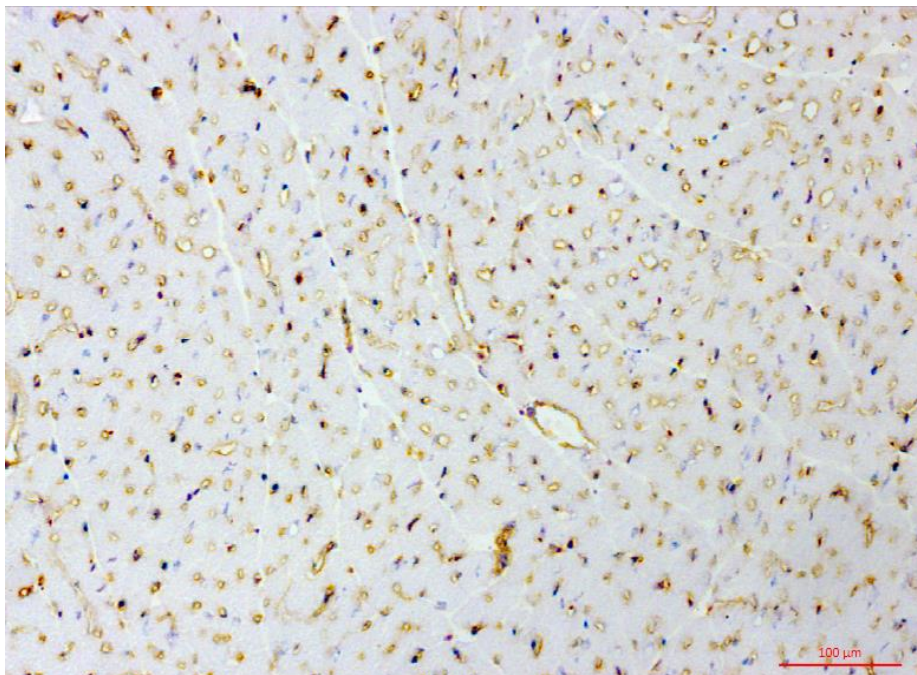


Abbildung 18: Lectin-Färbung, CIH

Linksventrikuläres Myokard im Querschnitt, 200-fache Vergrößerung

3.1.2 Molekularbiologische Untersuchung der angiogenetischen Marker

Bei der molekularbiologischen Untersuchung angiogenetischer Marker auf RNA-Ebene wurde besonderes Augenmerk auf VEGF (vascular endothelial growth factor)-A und B, KDR (Kinase insert domain receptor) sowie Notch 1 und Notch 3 gelegt. Zur besseren Vergleichbarkeit erfolgte die relative Normierung der ermittelten Werte mit der Kontrollgruppe (KON=1) als Referenz. Wie in Abbildung 19 dargestellt, ist auf RNA-Ebene eine erhöhte Expression angiogenetischer Signale zu verzeichnen:

VEGF- α	2,8-fach
VEGF- β	1,4-fach
KDR	4,3-fach
Notch 1	5,4-fach
Notch 3	7,1-fach

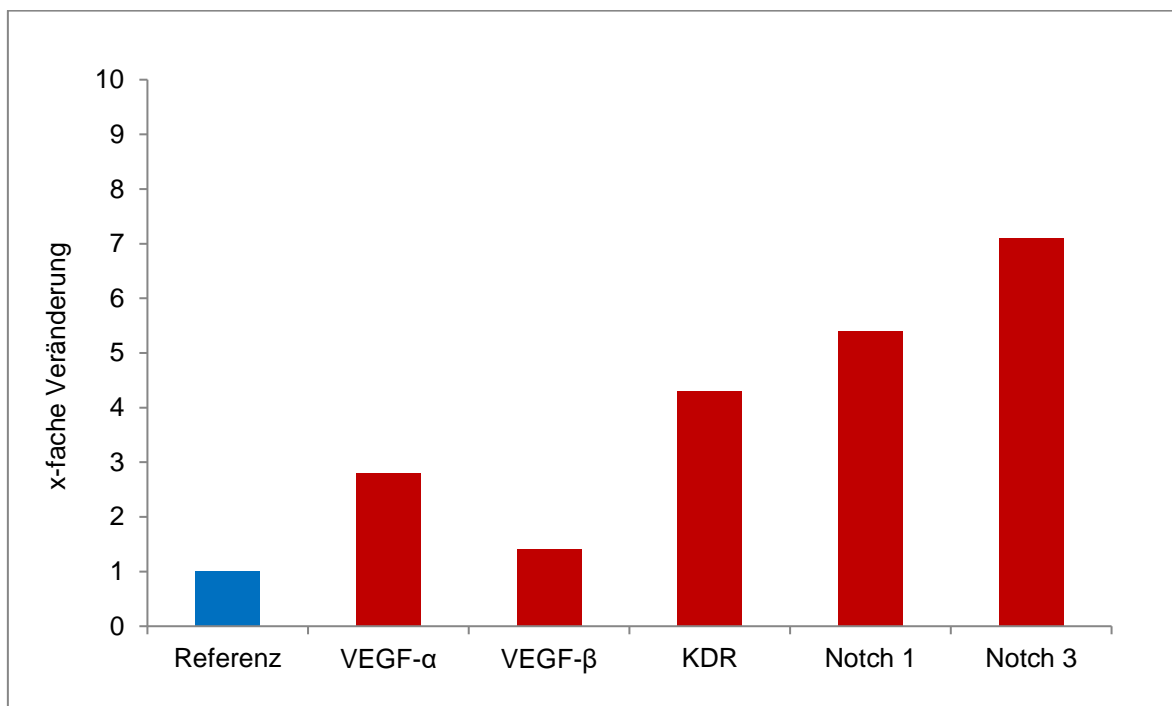


Abbildung 19: Ergebnisse der Untersuchung der angiogenetischen Marker

Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) angiogenetischer Marker (VEGF- α , VEGF- β , KDR, Notch1 und Notch3) im linksventrikulären Myokard von CIH- bzw. KON- (Referenz) Mäusen

3.2 Auswirkungen von CIH auf das Inflammationsniveau

3.2.1 Immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchung von COX-2

Immunhistomorphometrische Analysen zeigten, dass der prozentuale Anteil der COX-2-positiven Zellen im linksventrikulären Myokard der CIH-Mäuse signifikant ($p=0.002$) um 11,8% höher ist als bei KON-Mäusen (siehe Abbildungen 20, 21 und 22).

Untersuchungen der Genexpression mittels qRT-PCR zeigten eine 20-fach höhere COX-2-Expression im linksventrikulären Myokard von CIH- im Vergleich zu KON-Mäusen (siehe Abbildung 23).

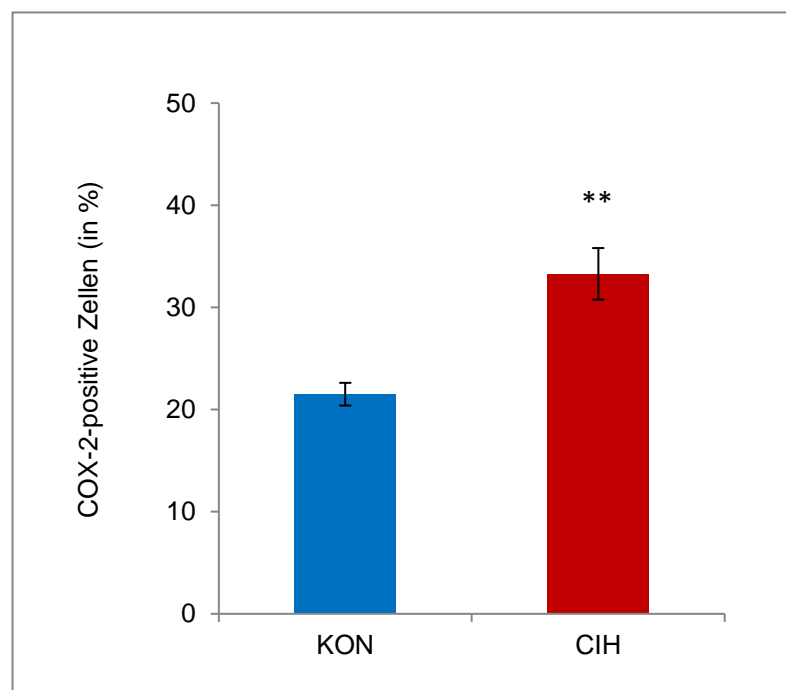


Abbildung 20: Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung von COX-2

Anteil (in %) der COX-2-positiven Zellen im linksventrikulären Myokard von KON- bzw. CIH-Mäusen. Gezeigt sind Mittelwert \pm SEM; $n=11/10$, $p=0.002$

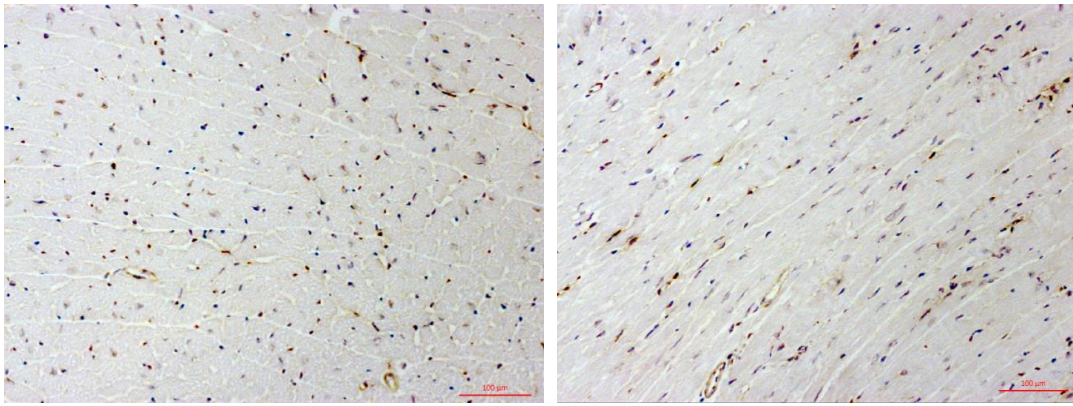


Abbildung 21: COX-2 Immunhistochemie, KON

Linksventrikuläres Myokard im Querschnitt (links) und Längsschnitt (rechts), 200-fache Vergrößerung

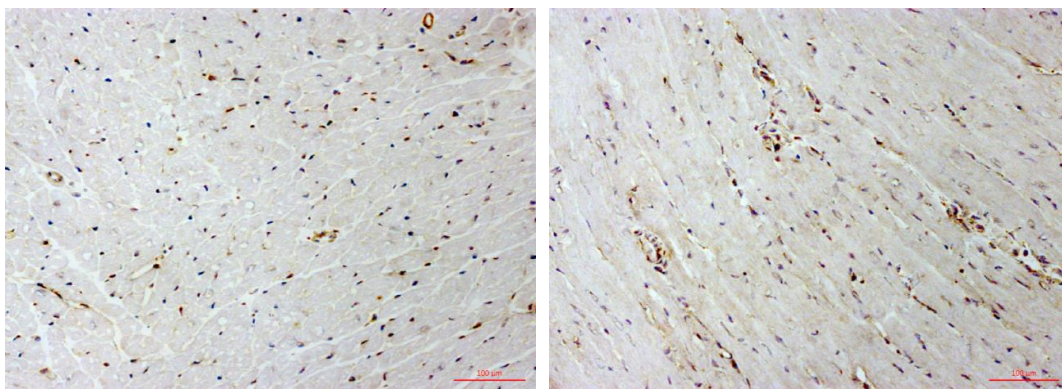


Abbildung 22: COX-2 Immunhistochemie, CIH

Linksventrikuläres Myokard im Querschnitt (links) und Längsschnitt (rechts), 200-fache Vergrößerung

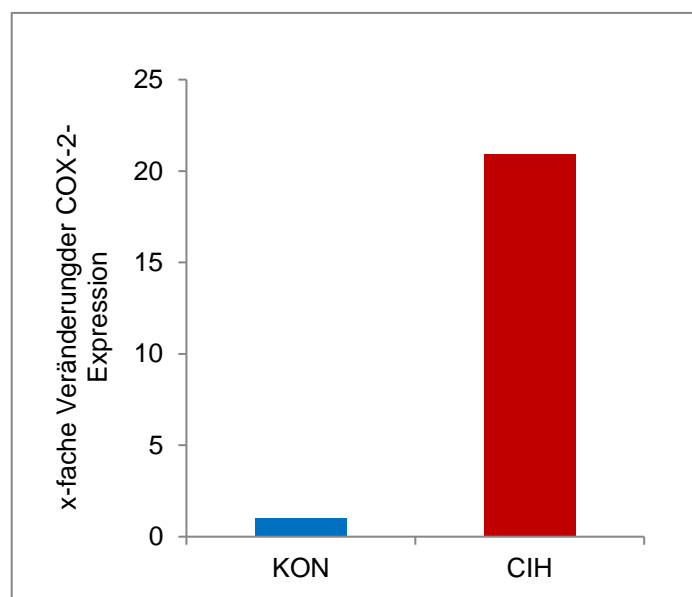


Abbildung 23: Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung von COX-2

COX-2 Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) im linksventrikulären Myokard von CIH- bzw. KON- (Referenz) Mäusen

3.2.2 Immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchung von TNF- α

Der Entzündungsmarker TNF- α zeigte sich unter CIH sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene hochreguliert. Wie in Abbildung 24 dargestellt, ist der prozentuale Anteil der TNF- α -positiv gefärbten Zellen im linksventrikulären Myokard der CIH-Mäuse signifikant ($p=0.0003$) um 6% höher als bei den KON-Mäusen (siehe auch Abbildungen 25 und 26). Untersuchungen der Genexpression mittels qRT-PCR zeigten eine 180-fach höhere TNF- α -Expression im Vergleich zu den KON-Mäusen (siehe Abbildung 27).

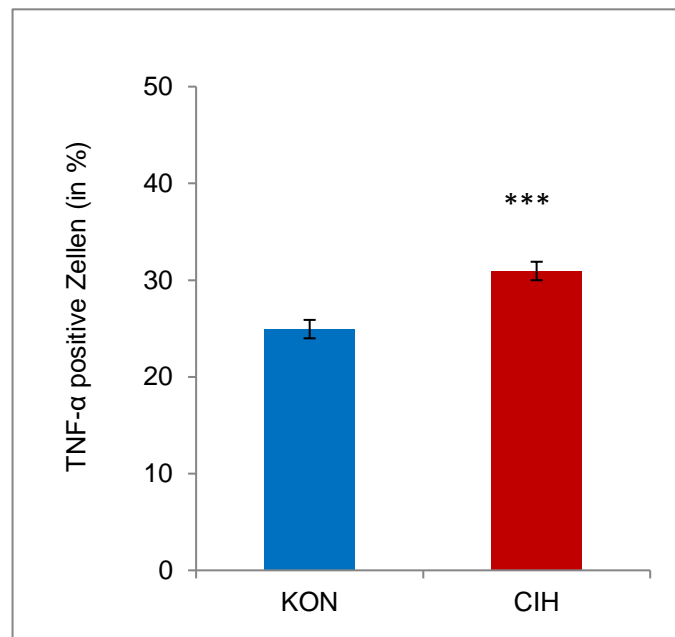


Abbildung 24: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von TNF- α
Anteil (in %) der TNF- α -positiven Zellen im linksventrikulären Myokard von KON- bzw. CIH-Mäusen. Gezeigt sind Mittelwert \pm SEM, $n=11/10$, $p=0.0003$

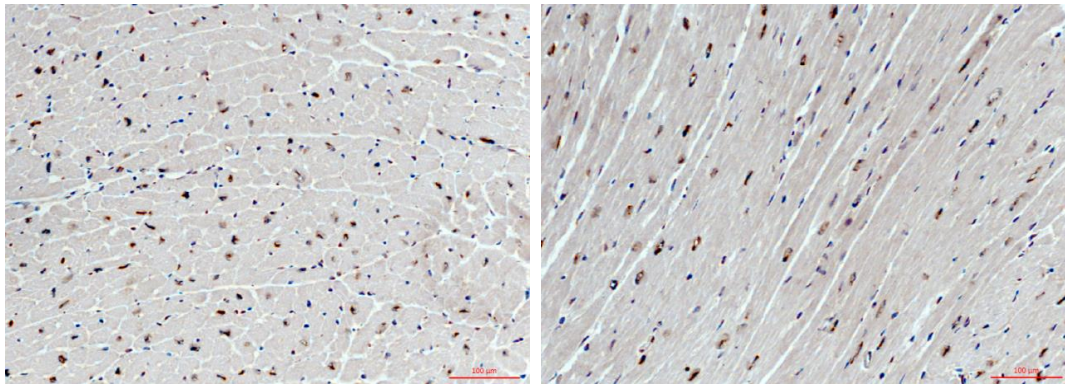


Abbildung 25: TNF-α Immunhistochemie, KON

Linksventrikuläres Myokard im Querschnitt (links) und Längsschnitt (rechts), 200-fache Vergrößerung

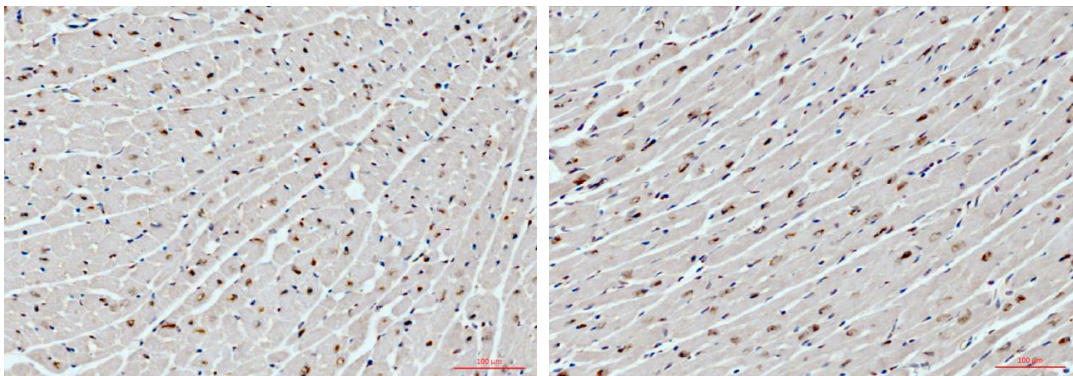


Abbildung 26: TNF-α Immunhistochemie, CIH

Linksventrikuläres Myokard im Querschnitt (links) und Längsschnitt (rechts), 200-fache Vergrößerung

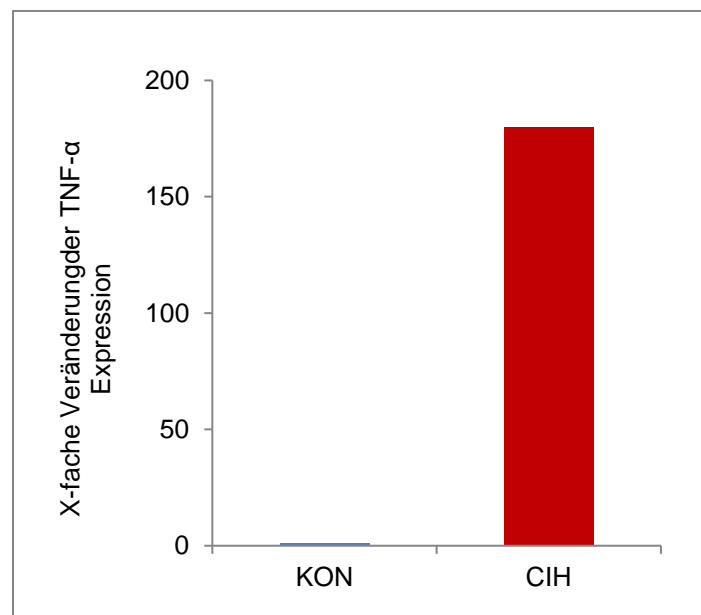


Abbildung 27: Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung von TNF-α

TNF-α Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) im linksventrikulären Myokard von CIH- bzw. KON-(Referenz) Mäusen

3.2.3 Immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchung von IL-1 β

Immunhistomorphometrische Untersuchungen zeigten, dass der prozentuale Anteil der IL-1 β -positiv-gefärbten Zellen im linksventrikulären Myokard der CIH-Mäuse um 3,6% und somit nicht signifikant ($p=0.07$) höher ist als bei den KON-Mäusen (siehe Abbildung 28, 29 und 30). Bei der Untersuchung der Genexpression mittels qRT-PCR konnte eine 2,8-fach höhere IL-1 β Expression im linksventrikulären Myokard von CIH-Mäusen detektiert werden im Vergleich zu KON-Mäusen (siehe Abbildung 31).

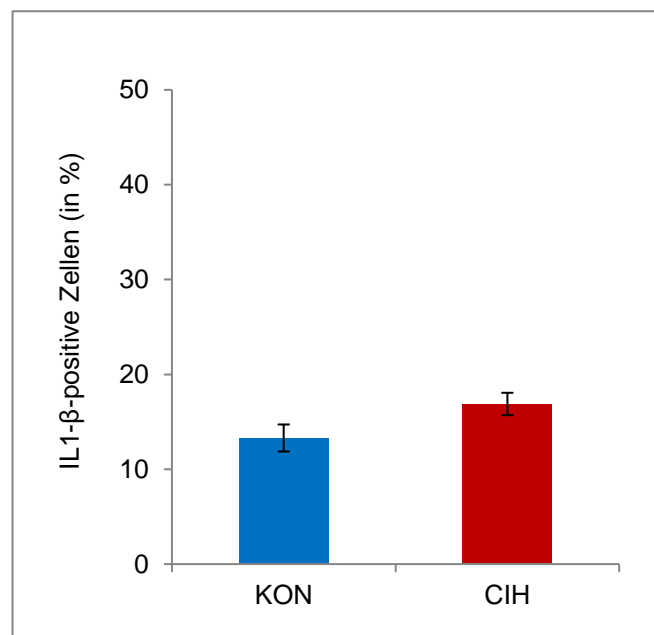


Abbildung 28: Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung von IL-1 β

Anteil (in %) der IL-1 β -positiven Zellen im linksventrikulären Myokard von KON- bzw. CIH-Mäusen. Gezeigt sind Mittelwert \pm SEM; $n=11/10$, $p=0.07$

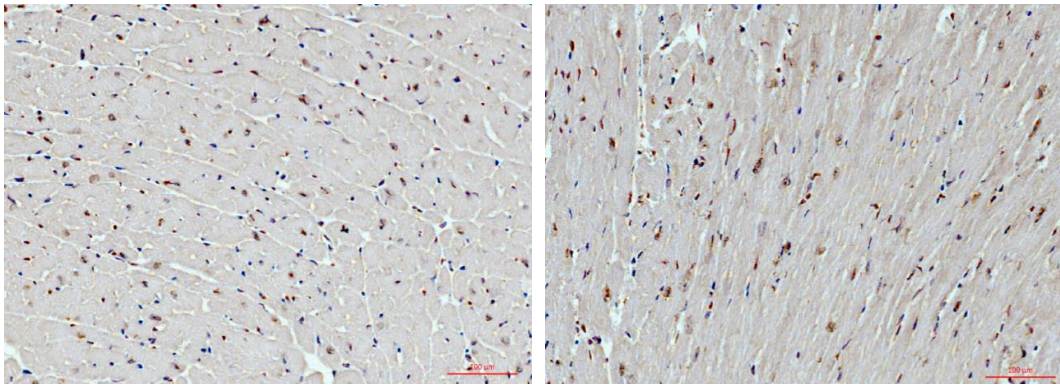


Abbildung 29: IL-1 β Immunhistochemie, KON

Linksventrikuläres Myokard im Querschnitt (links) und Längsschnitt (rechts), 200-fache Vergrößerung

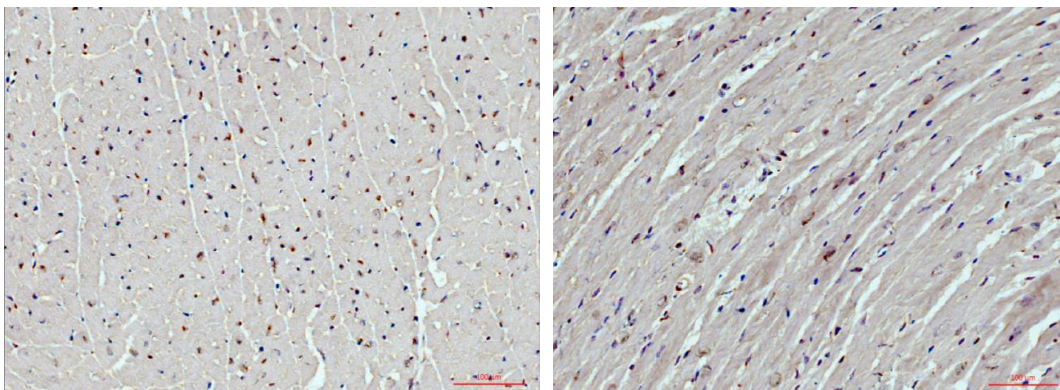


Abbildung 30: IL-1 β Immunhistochemie, CIH

Linksventrikuläres Myokard im Querschnitt (links) und Längsschnitt (rechts), 200-fache Vergrößerung

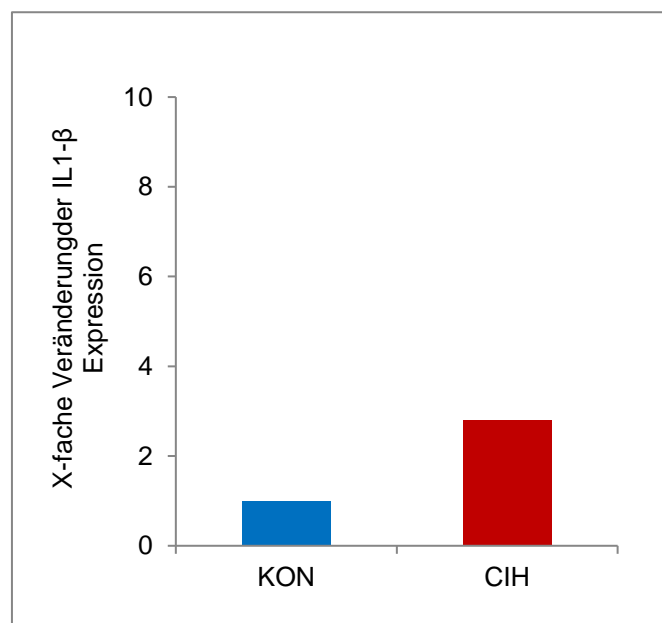


Abbildung 31: Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung von IL-1 β

IL-1 β Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) im linksventrikulären Myokard von CIH- bzw. KON-(Referenz) Mäusen

3.2.4 Molekularbiologische Untersuchung von IL-6

Untersuchungen der Genexpression des Inflammationsmarkers IL-6 mittels qRT-PCR zeigten eine 1,3-fach höhere IL-6 Expression im linksventrikulären Myokard von CIH- im Vergleich zu KON-Mäusen (siehe Abbildung 32).

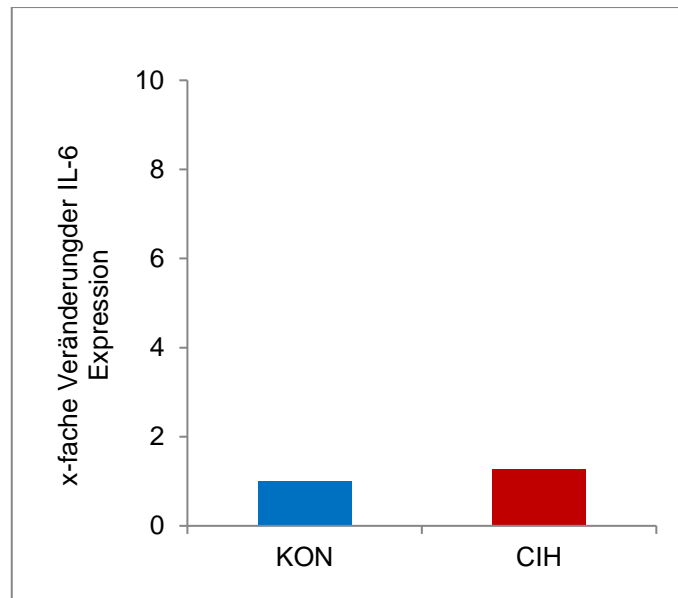


Abbildung 32: Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung von IL-6

IL-6 Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) im linksventrikulären Myokard von CIH- bzw. KON- (Referenz) Mäusen

3.3 Molekularbiologische Untersuchung von PMCA4a/b und PMCA4b

Untersuchungen der Genexpression von PMCA4a/b und PMCA4b zeigten eine 17-fach höhere PMCA4a/b Expression (siehe Abbildung 33) und eine 69-fach höhere PMCA4b Expression (siehe Abbildung 34) im linksventrikulären Myokard von CIH-Mäusen im Vergleich zu KON-Mäusen.

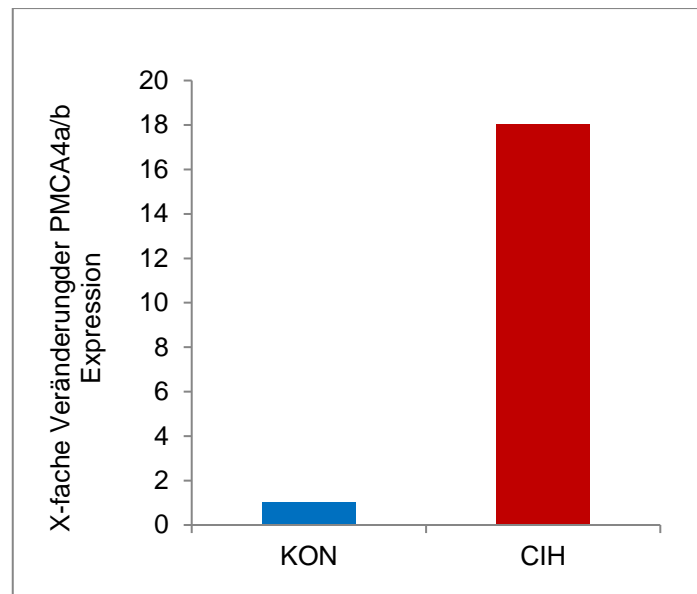


Abbildung 33: Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung der PMCA4a/b
PMCA4a/b Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) im linksventrikulären Myokard von CIH-Mäusen im Vergleich zu KON- (Referenz) Mäusen

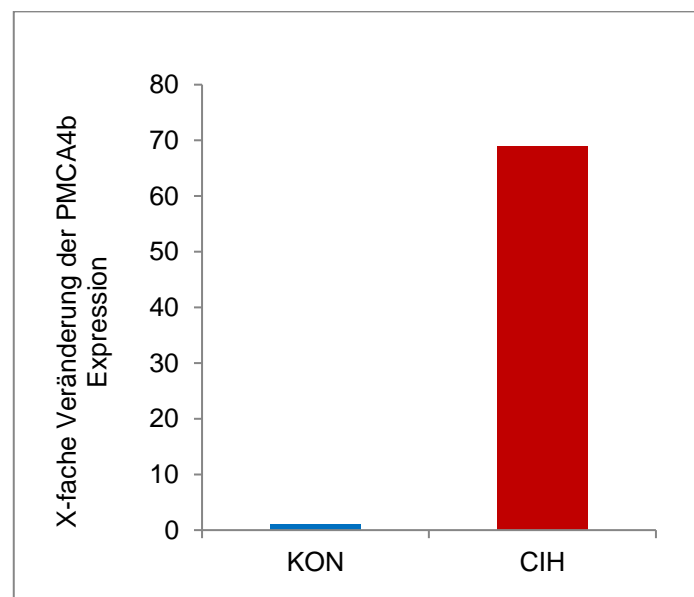


Abbildung 34: Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung der PMCA4b
PMCA4b Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) im linksventrikulären Myokard von CIH-Mäusen im Vergleich zu KON- (Referenz) Mäusen

3.4 Molekularbiologische Untersuchung von SOCS3

Wie in Abbildung 35 dargestellt, zeigte sich bei der Untersuchung der Genexpression von SOCS3 eine 80-fach höhere SOCS3 Expression im linksventrikulären Myokard bei CIH-Mäusen im Vergleich zu KON-Mäusen.

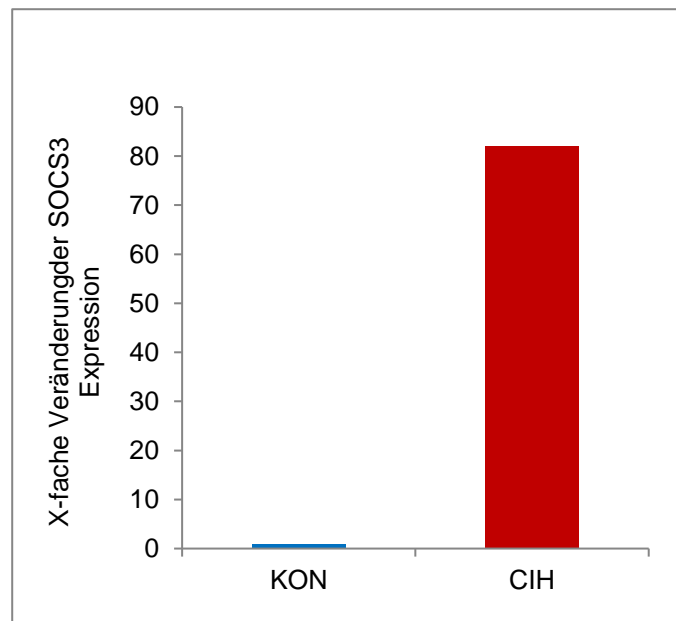


Abbildung 35: Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung von SOCS3

SOCS3 Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) im linksventrikulären Myokard von CIH-Mäusen im Vergleich zu KON- (Referenz) Mäusen

3.5 Molekularbiologische Untersuchung der Apoptosemarker

Untersuchungen der Apoptosemarker mittels qRT-PCR zeigten eine 1,4-fach höhere Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax, eine 7,7-fach höhere Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 und eine 88-fach höhere Expression des pro-apoptisch wirksamen Faktors Caspase 3 im linksventrikulären Myokard bei CIH-Mäusen im Vergleich zu KON-Mäusen (siehe Abbildung 36).

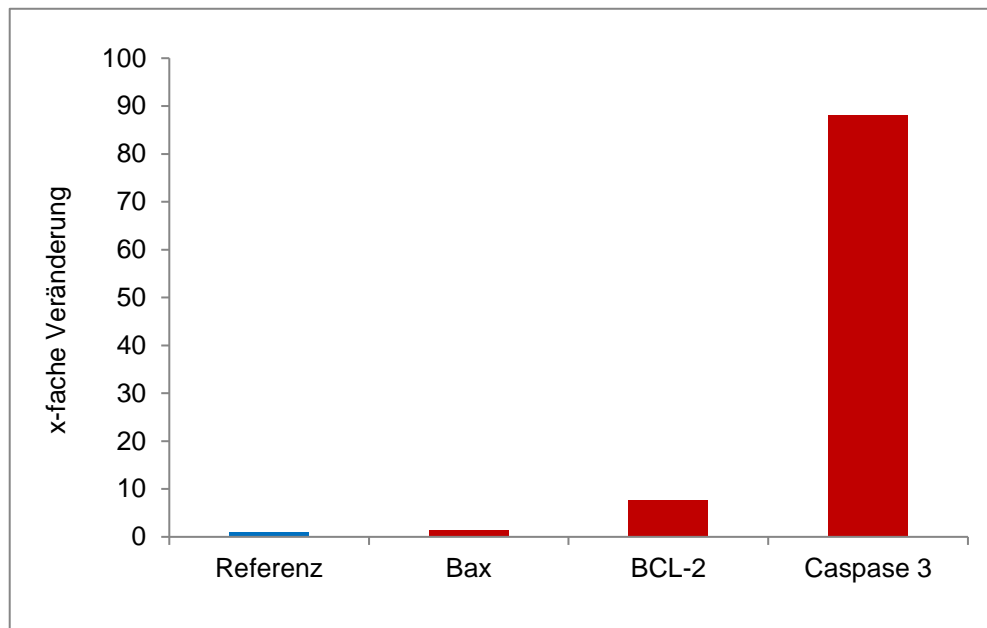


Abbildung 36: Ergebnisse der Untersuchung der Apoptose-Marker

Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) der Apoptosemarker (Bax, Bcl-2 und Caspase 3) im linksventrikulären Myokard von CIH-Mäusen bzw. KON- (Referenz) Mäusen

3.6 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Mitochondrien

3.6.1 Anzahl der Mitochondrien pro Fläche

Wie bereits erwähnt, zeigt eine Aufnahme in 16.000facher Vergrößerung eine Fläche von $40\mu\text{m}^2$ linksventrikulärem Myokard. Durch den Bildrand angeschnittene, nur zum Teil sichtbare Mitochondrien wurden mitgezählt. Wie Abbildung 37 zeigt, konnten in der KON-Gruppe ($n=5$) durchschnittlich $30,3 \pm 1,99$ (Mittelwert \pm SEM) Mitochondrien pro Bildausschnitt gezählt werden, in der CIH-Gruppe ($n=4$) waren es $32,0 \pm 2,96$ (Mittelwert \pm SEM) Mitochondrien. Die Anzahl der Mitochondrien pro Fläche zeigte sich im linksventrikulärem Myokard der CIH-Mäuse somit nicht signifikant ($p=0.65$) um 5,6% höher als bei den KON-Mäusen (siehe auch Abbildungen 38 und 39).

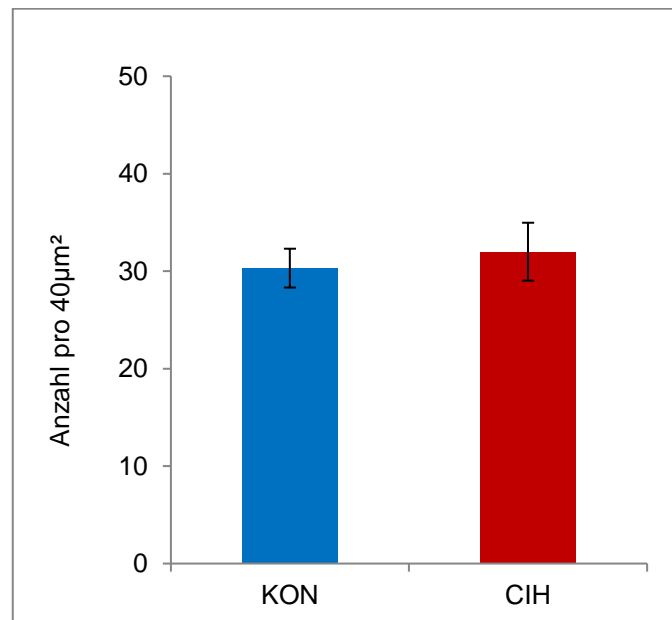


Abbildung 37: Anzahl der Mitochondrien pro $40\mu\text{m}^2$ linksventrikulärem Myokard von KON- bzw. CIH-Mäusen.
Gezeigt sind Mittelwert \pm SEM; $n=5/4$, $p=0.65$

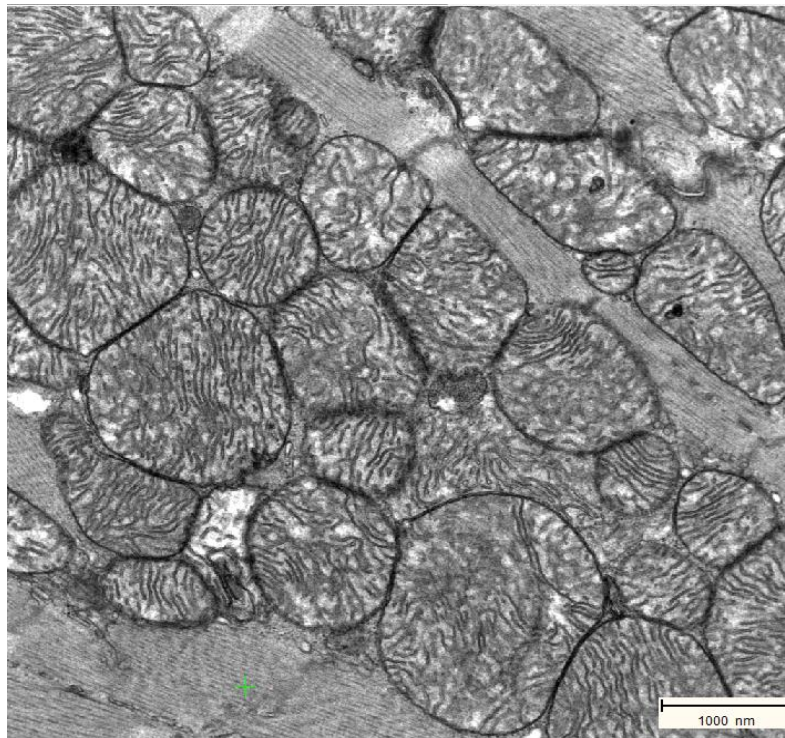


Abbildung 38: Elektronenmikroskopische Aufnahme, KON
Linksventrikuläres Myokard, 16.000-fache Vergrößerung

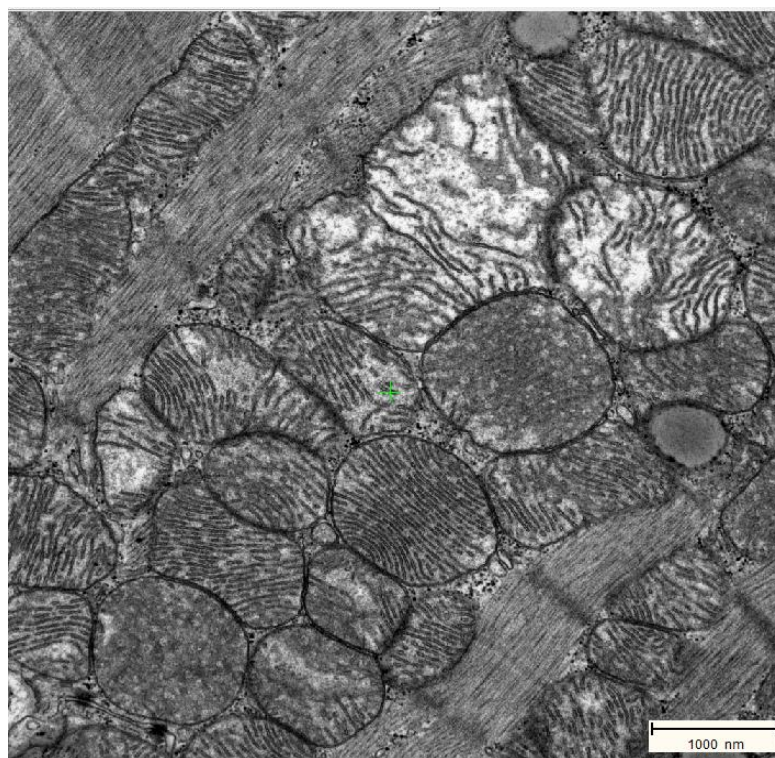


Abbildung 39: Elektronenmikroskopische Aufnahme, CIH
Linksventrikuläres Myokard, 16.000-fache Vergrößerung

3.6.2 Anteil der Mitochondrien an der Gesamtfläche

Wie die Abbildungen 38 und 39 zeigen, nehmen die Mitochondrien im linksventrikulären Myokard einen großen Teil der Gesamtfläche des Myokards ein. In der KON-Gruppe (n=5) liegt dieser Anteil bei $48,7\% \pm 3,06$ (Mittelwert \pm SEM), in der CIH-Gruppe (n=4) bei $50,9\% \pm 3,99$ (Mittelwert \pm SEM). Der Anteil der Mitochondrien an der Gesamtfläche linksventrikulären Myokards ist bei CIH-Mäusen folglich nicht signifikant ($p=0.66$) um 2,2% höher als bei KON-Mäusen (siehe Abbildung 40).

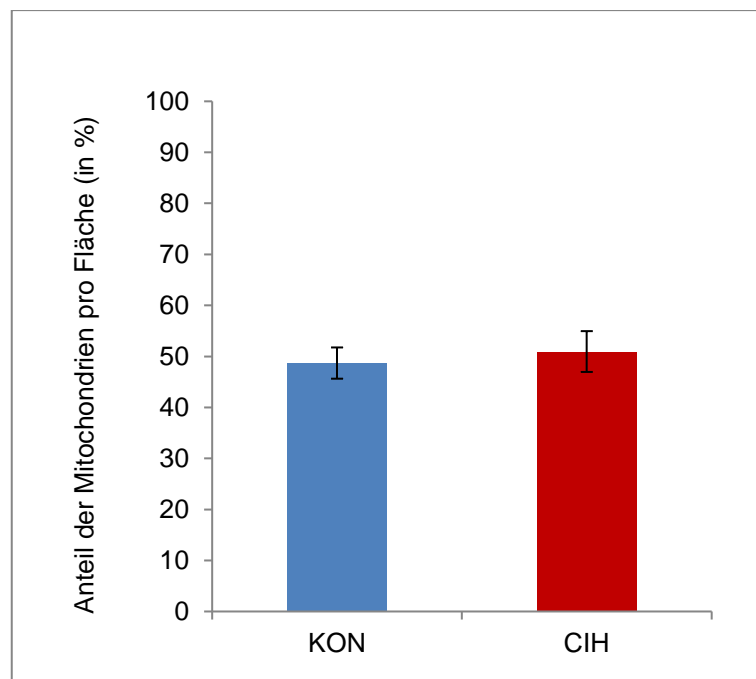


Abbildung 40: Anteil (in %) der Mitochondrienfläche an der Gesamtfläche
linksventrikulären Myokards bei KON- bzw. CIH-Mäusen
Gezeigt sind Mittelwert \pm SEM; n=5/4, p=0.66

3.6.3 Durchschnittliche Mitochondriengröße

Die Untersuchung der durchschnittlichen Mitochondriengröße ergab bei den KON-Mäusen (n=5) eine durchschnittliche Größe von $0,66 \mu\text{m}^2 \pm 0,04$ (Mittelwert \pm SEM), während bei den CIH-Mäusen (n=4) im Mittel $0,65 \mu\text{m}^2 \pm 0,06$ (Mittelwert \pm SEM) gemessen wurden. Die durchschnittliche Mitochondriengröße zeigte sich im linksventrikulären Myokard der CIH-Mäuse somit nicht signifikant ($p=0.89$) um 1,5% kleiner als bei den KON-Mäusen (siehe Abbildung 41).

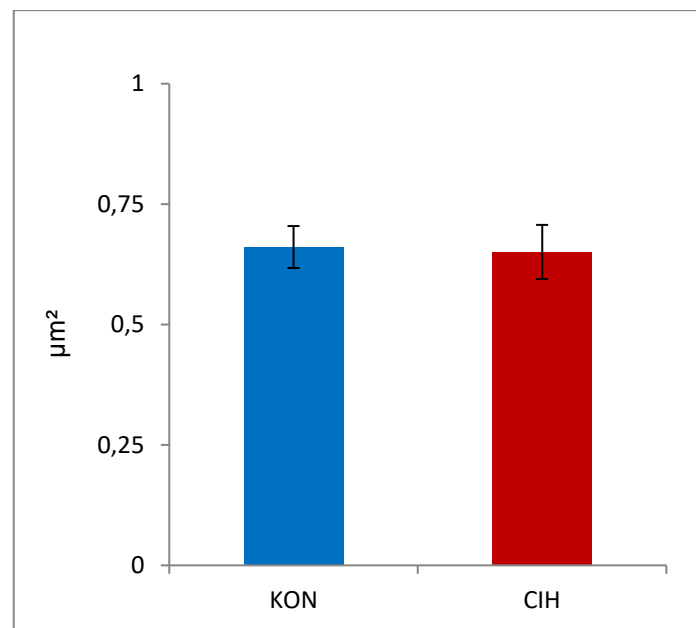


Abbildung 41: Durchschnittliche Mitochondriengröße (in μm^2)
im linksventrikulären Myokard von KON- bzw. CIH-Mäusen
Gezeigt sind Mittelwert \pm SEM; n=5/4, p=0.89

3.6.4 Integrität der Mitochondrien

Wie Abbildung 42 zeigt, ist der prozentuale Anteil der als intakt bewerteten Mitochondrien im linksventrikulären Myokard der CIH-Mäuse (n=4) signifikant ($p=0.01$) um 8,3% geringer als bei den KON-Mäusen (n=5). Der prozentuale Anteil der als defekt bewerteten Mitochondrien im linksventrikulären Myokard der CIH-Mäuse ist signifikant ($p=0.01$) um 8,5% höher als bei den KON-Mäusen.

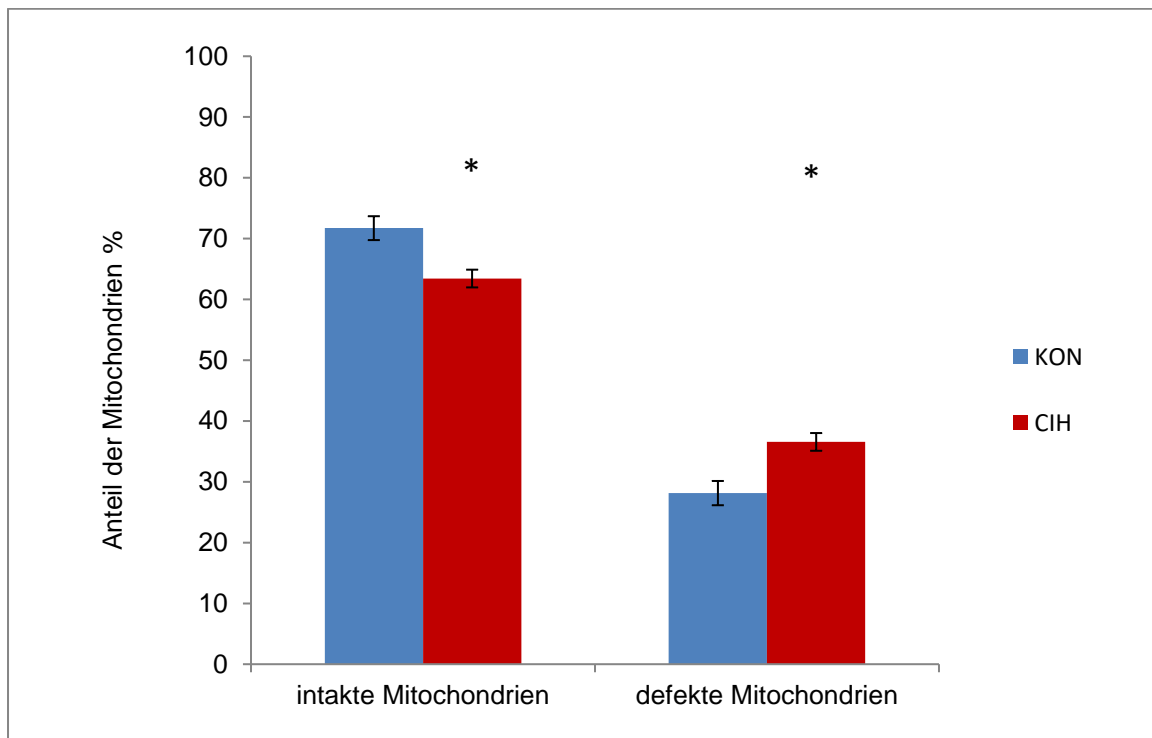


Abbildung 42: Integrität der Mitochondrien

Anteil (in %) der intakt und defekt gewerteten Mitochondrien im linksventrikulären Myokard von KON- bzw. CIH-Mäusen. Gezeigt sind Mittelwert \pm SEM; n=5/4, $p=0.01$

4 Diskussion

4.1 Das Mausmodell der CIH

Zur Untersuchung der histomorphologischen und molekularbiologischen Veränderungen des linksventrikulären Myokards bei OSAS wurde ein Mausmodell der CIH gewählt. Die Maus eignet sich besonders gut zur Erforschung einer Vielzahl von Erkrankungen, da ihr Genom vollständig entschlüsselt ist und sich die Möglichkeit des Gen-Knockouts oder Gen-Überexpression bietet (Tagaito et al. 2001; Dissertation Kraut 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kontrollgruppe mit einer Versuchsgruppe verglichen, ein Gen-Knockout ist nicht erfolgt.

Wie bereits im Kapitel 2.2.1 beschrieben, wurden die Tiere der Versuchsgruppe zur Imitation des Krankheitsbildes acht Stunden am Tag dem Hypoxie-Reoxygenierungs-Stress ausgesetzt. Die Dauer der Hypoxie-Episoden wurde entsprechend der durchschnittlichen Nachtruhe des Menschen ausgewählt (Dissertation Kraut 2014). Der Wechsel von Hypoxie und Normoxie erfolgte alle 60 Sekunden, woraus sich 30 Apnoe-Hypopnoe-Episoden pro Stunde ergeben und somit ein (mittel-) schweres Schlafapnoe-Syndrom (AHI =30) vorliegt. Dies passt zur aktuellen Datenlage, laut welcher insbesondere die moderate und die schwere OSAS-Form zur signifikant erhöhten Wahrscheinlichkeit von Folgeerkrankungen wie arterieller Hypertonie, koronarer Herzerkrankung und Herzinsuffizienz führt (siehe 1.2 und 1.3.).

Jedoch existieren einige limitierende Faktoren, welche die Übertragbarkeit des Maus-Modells der CIH auf den Menschen einschränken. So wurden die nachtaktiven Mäuse der Hypoxie zwar entsprechend ihrer Nachtphase ausgesetzt, allerdings unabhängig davon, ob sie tatsächlich schliefen oder nicht. Somit konnten in diesem Versuch weder die charakteristischen Arousals noch die Schlafragmentierung simuliert werden, welche Zamarrón et al. neben den repetitiven Hypoxie-Reoxygenierungs-Episoden als Ausgangspunkt für die entstehenden kardiovaskulären Pathologika ansehen (Zamarrón et al. 2013). Des Weiteren konnte bei den Tieren nicht die für das Krankheitsbild besonders typische Obstruktion der oberen Atemwege erzeugt werden, infolge dessen auch die Auswirkungen der intrathorakalen Druckschwankungen von OSAS-Patienten nicht simuliert und untersucht werden konnten. Dabei fehlten auch die begleitenden OSAS-typischen CO₂-Schwankungen beim Menschen, da die Maus in der Hypoxie-Phase eine gesteigerte statt einer unterbrochenen Ventilation aufweist (Dissertation Kraut 2014).

Trotz dieser Einschränkungen hinsichtlich der Imitation der OSAS-bezogenen pathophysiologischen Komponenten gilt das Maus-Modell der CIH als das am besten geeignete für die Nachstellung und Erforschung des OSAS (Lee et al. 2009; Dissertation Kraut 2014).

Ebenfalls von Interesse sind die Auswirkungen von chronisch konstanter Hypoxie (CCH) bzw. die Abhängigkeit der Veränderungen vom Schweregrad der Hypoxie, welche bereits Fan et al. in einem Maus-Modell untersuchten (Fan et al. 2005) und dessen Resultate in Kapitel 4.2 weiterführend diskutiert werden sollen.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die histologischen Untersuchungen die linksventrikulären Myokardproben jedes Versuchstieres bearbeitet. Im Rahmen der PCR-Messungen war dies aufgrund eines Mangels an Gewebe nicht möglich, sodass jeweils fünf Proben der Tiere einer Versuchsgruppe gepoolt wurden. Dies stellt nicht die optimale Lösung dar, sodass diese Untersuchungen ggf. in zukünftigen Projekten wiederholt werden sollten, um differenzierte Ergebnisse zu den einzelnen Tieren zu erhalten.

Die im Rahmen des OSAS auftretenden Hypopnoen und Apnoen führen zu einer inadäquaten alveolären Ventilation, was eine unzureichende Sauerstoffversorgung mit konsekutiver Verminderung des p_aO_2 zur Folge hat. Es handelt sich hierbei um eine hypoxische Hypoxämie. Davon abzugrenzen ist die ischämische Hypoxämie, deren Ursache in einem herabgesetzten bzw. unterbrochenem Blutfluss liegt (Cross und Plunkett 2014). In der Literatur wird die chronisch intermittierende Hypoxie und die damit einhergehenden Hypoxie-Reoxygenierungs-Episoden nicht selten mit myokardialer Ischämie und darauffolgender Reperfusion verglichen (Lavie 2003; Park et al. 2007; Lavie 2015). Aus diesem Grund wurde bei Betrachtung der vorhandenen Literatur für die Bearbeitung der vorliegenden Dissertation sowohl Daten zu Hypoxie und deren Auswirkungen auf das Myokard, als auch zu Ischämie herangezogen (s. Abb. 5 und 6).

4.2 Auswirkungen von CIH auf myokardiale Angiogenese

Ähnlich den Ergebnissen von Fan et al. 2005 konnte Frau Dr. Simone Kraut im Rahmen ihres Projekts einen signifikanten Anstieg des Hämatokrits infolge der sechswöchigen CIH-Exposition detektieren (Dissertation Kraut 2014). Dies ist als physiologische adaptive Antwort des Organismus auf eine unzureichende Sauerstoffversorgung zu verstehen, bei der es infolge einer gesteigerten Erythropoese und Erhöhung der Hämoglobinkonzentration kommt. Auf diese Weise kann die Sauerstofftransportkapazität des Blutes verbessert und

die hypoxischen Zustände zum Teil kompensiert werden (Fan et al. 2005; Woods et al. 2011).

VEGF-A, VEGF-B, KDR

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CIH im Myokard zu einer Hochregulation der angiogenetischen Signale auf RNA-Ebene führt. So war im Vergleich zur KON-Gruppe als Referenz in der Versuchsgruppe VEGF-A 2,8-fach und VEGF-B 1,4-fach erhöht, während der VEGF-Rezeptor 2 (KDR) sogar eine 4,3-fach gesteigerte Expression aufwies. Wie in zahlreichen Studien nachgewiesen wurde, geht OSAS im Vergleich zu gesunden Probanden mit erhöhten VEGF-Serumspiegeln einher (Imagawa et al. 2001; Schulz et al. 2002; Lorier et al. 2011), was ebenfalls als adaptive Antwort des Organismus auf die unzureichende Sauerstoffversorgung des Gewebes gesehen werden kann. Die Vorgänge sind dabei von der Schwere der Hypoxie abhängig:

Unter moderater Hypoxie kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF, welcher als Hauptregulator der Sauerstoffhomöostase (Dery et al. 2005) für die Anpassung der Zelle an hypoxische Zustände verantwortlich ist (Cummins und Taylor 2005). Dies wird unter anderem durch die Induktion proangiogenetisch wirksamer Proteine wie beispielsweise VEGF gewährleistet, was die Proliferation von Endothelzellen, die Stabilisierung der Gefäßwand und die Hemmung von Apoptose zur Folge hat. Es bilden sich ausgehend vom vorhandenen Kapillargeflecht neue Gefäße, welche zur Verbesserung der Perfusion beitragen und die Widerstandsfähigkeit des Gewebes gegenüber Hypoxie erhöhen (Lorier et al. 2011). Laut Waltenberger et al. ist VEGF ein spezifisches endotheliales Mitogen, das therapeutisch für die Induktion von Angiogenese im ischämischen Myokard genutzt werden kann (Waltenberger et al. 1996). Eine protektive Wirkung von moderater Hypoxie auf den Herzmuskel konnten auch Wang und Si anhand des Rattenmodells bestätigen, in welchem sie den Effekt von kurzzeitiger intermittierender Hypoxie auf die myokardiale Struktur und Funktion untersuchten (Wang und Si 2013). Angesichts der gesteigerten Expression des anti-apoptotischen Markers Bcl-2 konnte gezeigt werden, dass es, vermittelt durch die Hochregulation von HIF und VEGF, zur Inhibierung von Apoptose und oxidativem Stress kommt. Eine signifikante Zunahme der myokardialen Kapillardichte konnte nach einer vierwöchigen Exposition mit intermittierender Hypoxie beobachtet werden (Wang und Si 2013).

In unserem Mausmodell zeigte sich die Expression von VEGF und KDR auf RNA-Ebene erhöht, in der histochemischen Lektin-Färbung fehlte jedoch der morphologische Nachweis der Neoangiogenese. Trotz einer frühzeitigen Hochregulation angiogenetischer Signale scheint die Angiogenese in unserem Modell ineffektiv zu sein. Es stellt sich somit die Frage

nach möglichen Ursachen für die fehlende Kapillarneubildung. Ein Erklärungsansatz kann in einer zu kurzen oder zu langen Versuchsdauer gesehen werden. Die Hypothese hierbei ist, dass es im Falle einer längeren Versuchsdauer möglicherweise noch zu signifikanten histomorphologischen Veränderungen gekommen wäre, bzw. dass sich die Kapillarzahl bereits zu Beginn des Experiments als adaptive Antwort erhöht, im Folgenden jedoch aufgrund einer toxischen Hypoxie-Wirkung wieder reduziert hat. In der vorliegenden Arbeit ist der proliferativ auf Endothelzellen wirkende Wachstumsfaktor VEGF-A in der Versuchsgruppe zwar 2,8-fach hochreguliert im Vergleich zur Kontrollgruppe, der für die Erhaltung der neu entstandenen Blutgefäße essentielle Faktor VEGF-B (siehe 1.3.1) jedoch nur 1,4-fach. Diese Tatsache würde die These stützen, dass zwar pro-angiogenetische Signale vorhanden sind, die neu entstandenen Gefäße aufgrund einer unzureichenden VEGF-B-Expression jedoch nicht erhalten werden können.

Ein weiterer Erklärungsansatz kann darin gesehen werden, dass es, im Gegensatz zum zuvor erläuterten Mechanismus, unter besonders schwerer Hypoxie nicht zur Proliferation, sondern zur Apoptose von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Kardiomyozyten kommt (Lorier et al. 2011). Auch Han et al. untersuchten anhand eines Ratten-Modells die Auswirkungen von intermittierender Hypoxie auf das Myokard und detektierten neben einer Hochregulation der pro-apoptotischen Moleküle Bax und Caspase 3 eine verminderte Kapillardichte sowie eine verstärkte interstitielle Fibrose. Die kardiale Schädigung sahen sie am ehesten in einer Akkumulation von Cholesterol im Myokard und der Caspase-abhängigen Induktion der Apoptose begründet (Han et al. 2014).

Hierin zeigen sich Parallelen zu unseren Daten, erkennbar an dem ebenfalls hochregulierten pro-apoptischen Signalfaktor Caspase 3 (88-fach) sowie der fehlenden Zunahme der Kapillardichte. Die These, dass es infolge eines schwerwiegenden langanhaltenden Sauerstoffmangels zur verstärkten Induktion von apoptotischen Vorgängen kommt, soll in Kapitel 4.4 weiterführend diskutiert werden.

In unserem Experiment konnte der Fettstoffwechsel des Myokards nicht untersucht werden, sodass die Rolle der Cholesterol-Akkumulation bezüglich ihrer Bedeutung für die kardiale Schädigung nicht eruiert werden kann.

Notch1 und 3

Im Hinblick auf die myokardiale Angiogenese sollte auch die Rolle von Notch diskutiert werden. Der Signalweg ist an der Regulation einer Vielzahl an Prozessen wie der Differenzierung, Proliferation und Regeneration von Zellen sowie der Apoptose beteiligt (Gude et al. 2008) und spielt eine wichtige Rolle in der Organogenese des Herzens. Dabei ist Notch insbesondere für die Entwicklung des linken Ventrikels und die Spezifizierung der

Koronargefäße vonnöten (de la Pompa et al. 2012). Die Expression wird durch Gefäßverletzungen und myokardiale Schädigungen (z.B. Druckbelastung) induziert, sodass dem Protein eine wichtige Funktion hinsichtlich der Regeneration von Herz und Gefäßen zugeschrieben werden kann (Lindner et al. 2001; Gude et al. 2008; Rizzo et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit konnte in der Versuchsgruppe eine 5,4-fach erhöhte Expression von Notch1 und eine 7,1-fache Hochregulation von Notch3 im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden, wobei sowohl Schäden am Gefäßsystem infolge endothelialer Dysfunktion und Arteriosklerose als auch Hypertonie-bedingte Myokardschäden zur Induktion des Gens geführt haben könnten. Wie bereits in Kapitel 1.3.1 beschrieben, modulieren Notch1 und sein hochaffiner Ligand Dll4 die VEGF-A-induzierte Angiogenese durch die Regulation der gefäßaussprossenden und gefäßbildenden Zellen (Jakobsson et al. 2009), wobei das Protein jedoch auch in Abwesenheit von VEGF-A über den VEGFR3-Rezeptor angiogenetisch wirksam sein kann (Benedito et al. 2012). Auch Kratsios et al. konnten anhand eines Maus-Modells zeigen, dass eine Notch-Aktivierung im infarzierten Myokard mit einer erhöhten Expression angiogenetischer Marker und verbesserten Herzfunktion einhergeht (Kratsios et al. 2010). Rizzo et al. betiteln Notch als einen Hauptmodulator der Angiogenese (Rizzo et al. 2014), dem auch eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und Reperfusion ischämischer Extremitäten zugesprochen wird (Liu et al. 2012; Trindade et al. 2012). Liu et al. untersuchten in diesem Zusammenhang anhand eines Maus-Modells die Auswirkungen einer Inhibition des Notch-Liganden Dll4, welcher unter Hypoxie vom arteriellen Gefäßendothel exprimiert wird, und konnten dabei paradoxe Effekte detektieren: So führt die Dll4-Inhibition einerseits zur verminderten Reifung und Perfusion der neu entstandenen Gefäße, andererseits aber zu einer gleichzeitigen Erhöhung der Kapillardichte. Liu et al. gelangten somit zu der Schlussfolgerung, dass eine partielle bzw. intermittierende Hemmung von Dll4 eine schnellere Wiederherstellung der Gewebsperfusion nach Verletzungen und ischämischen Zuständen ermöglicht (Liu et al. 2012). Diesen Ergebnissen entsprechend wäre in unserem Versuch ebenfalls eine erhöhte Kapillardichte infolge der Hochregulation von Notch1 und Notch3 zu erwarten gewesen, die sich jedoch nicht bestätigen ließ.

TNF- α , IL-1 β , IL-6

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die insuffiziente Angiogenese findet sich in der systemischen Inflammation, zu welcher es im Rahmen des OSAS kommt. In unserem Maus-Modell zeigten sich in der Versuchsgruppe die Zytokine TNF- α 180-fach, IL1- β 2,8-fach und IL-6 1,3-fach hochreguliert im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei insbesondere

TNF- α und IL1- β zu einer Dysregulation des Notch-Signalweges führen können (Quillard et al. 2010). Dies hat eine verstärkte Apoptose zur Folge, da Notch protektiv auf Endothelzellen wirkt und sie durch Hochregulation des anti-apoptotischen Bcl2 vor dem programmierten Zelltod schützt. Eine Notch-Inhibition kann daher zu einer endothelialen Dysfunktion führen und die Entstehung von Arteriosklerose begünstigen (Quillard et al. 2008; Walshe et al. 2011; Rizzo et al. 2014). Außerdem kommt es intrazellulär zu vermehrtem Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies und einer Hemmung der Endothelzellproliferation (Cai et al. 2014).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass trotz einer erhöhten Expression der pro-angiogenetischen Marker VEGF-A und KDR die Kapillardichte im Myokard der CIH-exponierten Mäuse nicht signifikant zugenommen hat. Dies könnte zum einen der Tatsache geschuldet sein, dass die Versuchsdauer nicht ausreichend lang war und sich Veränderungen erst noch im Laufe der Zeit gezeigt hätten. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die bereits neu entstandenen Gefäße aufgrund einer unzureichenden Expression des gefäßerhaltenden Wachstumsfaktors VEGF-B nicht überleben konnten. Auch die Induktion von Apoptose infolge der Hypoxämie ist als Erklärung für die unveränderte Kapillardichte denkbar, welche statt zur Proliferation und Differenzierung zum programmierten Zelltod von Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Stromazellen führt. Außerdem könnte die Funktion des pro-angiogenetischen Moleküls Notch durch das pro-inflammatorische Milieu infolge Zytokin-Hochregulation gestört sein.

4.3 Auswirkungen von CIH auf die ventrikuläre Funktion

Das OSAS geht mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz einher (Shahar et al. 2001; Gottlieb et al. 2010), wobei sowohl die systolische Herzinsuffizienz infolge einer verminderten Pumpfunktion als auch die diastolische Herzinsuffizienz, bedingt durch eine herabgesetzte Dehnbarkeit der Ventrikel, im Rahmen der Atemstörung auftreten können (Shahar et al. 2001; Vitarelli et al. 2013). Korrelierend mit der hohen Prävalenz von Hypertonie kann bei den OSAS-Patienten häufiger eine linksventrikuläre diastolische Dysfunktion beobachtet werden (Arias et al. 2005; Pack und Gislason 2009), wobei diese von der Höhe des systolischen Blutdrucks und der Schwere des nächtlichen SpO₂-Abfalls abhängig ist (Baguet et al. 2010).

Zur Diskussion der Studienlage und als funktionelle Hintergrundinformationen zu den linksmyokardialen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit werden im Folgenden die Daten von Frau Dr. Simone Kraut dargestellt: Zur Untersuchung der systolischen

Pumpfunktion des Herzens der Mäuse bestimmte Frau Dr. Simone Kraut das Herzminutenvolumen (cardiac output, CO) mittels Echokardiographie und zog zum Ausgleich möglicher Verfälschungen durch das Körpergewicht der Mäuse zusätzlich den cardiac index (CI) heran. Dabei zeigten sich nur geringfügige (nicht signifikante) Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (KON-Mäuse: CO 23,4 ml/min, CI 0,91 ml/min/KGW; CIH-Mäuse: CO 19,5ml/min, CI 0,75 ml/min/KGW). Auch bei Betrachtung der Ejektionsfraktion (EF) des linken Ventrikels konnten keine Unterschiede festgestellt werden (EF der KON-Mäuse: 64,0%, EF der CIH-Mäuse: 62,3%). Weitere Parameter zur Erhebung der systolischen Funktion (LV/RV peak systolic velocity und tricuspid annular plane systolic excursion, TAPSE) zeigten sich ebenfalls unauffällig (Dissertation Kraut 2014). Diese Ergebnisse stehen somit im Gegensatz zu den bei OSAS-Patienten beobachteten Daten, welche sowohl eine eingeschränkte rechtsventrikuläre Funktion als auch eine mit dem AHI korrelierende Verschlechterung der Herzfunktion zeigten (Altekin et al. 2012). Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen OSAS-Patienten und dem Maus-Modell sieht Kraut in Speziesunterschieden und der Tatsache, dass die Mäuse während der Messung der Werte in Narkose lagen (Dissertation Kraut 2014).

Bei der Erhebung der IVRT (isovolumic relaxation time) zur Analyse der diastolischen Funktion des linken und rechten Ventrikels konnte jedoch eine signifikant verminderte diastolische Funktion beobachtet werden (KON-Mäuse: linker Ventrikel 13,7%, rechter Ventrikel 13,9%, $p < 0,05$; CIH-Mäuse linker Ventrikel 17,6%, rechter Ventrikel 18,0%, $p < 0,05$). Auch der LV E'/A' peak diastolic velocities zur isolierten Beurteilung der linksventrikulären diastolischen Funktion war signifikant vermindert. Diese von Frau Dr. Simone Kraut ermittelten Werte decken sich folglich mit den Ergebnissen anderer Studien (Haruki et al. 2009; Altekin et al. 2012; Dissertation Kraut 2014).

Um die globale Funktion des Herzens einzuschätzen, bestimmte Frau Dr. Simone Kraut außerdem den MPI (myocardial performance index) bestimmt, welcher sich sowohl für rechten als auch für den linken Ventrikel signifikant vermindert zeigte (KON-Mäuse: linker Ventrikel 0,75, rechter Ventrikel 0,72, $p < 0,01$; CIH-Mäuse: linker Ventrikel 0,92; rechter Ventrikel 1,01, $p < 0,01$) (Dissertation Kraut 2014). Dieses Ergebnis entspricht den bei OSAS-Patienten erhaltenen Daten (Dursunoglu et al. 2005; Gao et al. 2009), welche eine Korrelation mit dem AHI erkennen ließen (Gao et al. 2009).

In Anbetracht dieser Daten sind nun die zugrundeliegenden molekularbiologischen und histomorphologischen Mechanismen, die im Rahmen des OSAS zur Entstehung einer Herzinsuffizienz beitragen können, von besonderem Interesse und werden im Folgenden erläutert.

TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2

Das OSAS geht mit repetitiven Hypoxämie/Reoxygenierungs-Episoden und Schlafragmentierung einher, was über eine Aktivierung des Sympathikus, eine erhöhte Katecholaminausschüttung und die Bildung freier Sauerstoffradikale zur endothelialen Dysfunktion und systemischen Inflammation führt. Der Hauptregulator der Entzündungsantwort ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 reguliert. Diese Zytokine wiederum induzieren die Expression der COX-2, welche gemeinsam mit der COX-1 für die Prostaglandinsynthese aus Arachidonsäure verantwortlich ist (Lin et al. 2004; Ke et al. 2007). Bei OSAS-Patienten konnten, wie bereits in Kapitel 1.2.1 erwähnt, erhöhte Serum- (Minoguchi et al. 2004; Imagawa et al. 2004; Ciftci et al. 2004), Blut- (Ryan et al. 2005) und Urinspiegel (Beaudin et al. 2014) der Entzündungsmediatoren detektiert werden.

TNF- α ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das von Monozyten und anderen Immunzellen gebildet wird. Es ist an der Entwicklung von Arteriosklerose beteiligt, indem es über die Ausschüttung von Adhäsions-Molekülen die Infiltration der Monozyten in das Endothel begünstigt und die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen stimuliert (Glass und Witztum 2001). Minoguchi et al. konnten zeigen, dass sowohl die TNF- α -Produktion durch Monozyten als auch die TNF- α -Serumspiegel bei OSAS-Patienten signifikant erhöht sind (Minoguchi et al. 2004). Verglichen wurde mit einer Gruppe aus Normalgewichtigen sowie einer Gruppe aus übergewichtigen Probanden. Auch Ciftci et al. untersuchte die Expression der Entzündungsmediatoren bei OSA-Patienten in Abhängigkeit vom Gewicht und konnte belegen, dass die TNF- α - und IL-6-Serumspiegel bei übergewichtigen OSA-Patienten im Vergleich zu Übergewichtigen ohne OSA signifikant erhöht sind, wobei der Anstieg mit dem AHI korrelierte (Ciftci et al. 2004). Es kann vermutet werden, dass die CIH ursächlich für die verstärkte Produktion der Zytokine ist. Auch bei Patienten mit ischämischer Herzerkrankung im Myokard wurde eine vermehrte Expression von TNF- α detektiert (Vaddi et al. 1994; Kukiela et al. 1995; Herskowitz et al. 1995).

Passend dazu zeigen sich auch die Ergebnisse von Ryan et al., welche in HeLa-Zellen eine NF- κ B-Aktivierung infolge CIH mit anschließender Reoxygenierung detektieren konnten (Ryan et al. 2005).

Die Vermutung, dass repetitive hypoxische Zustände über eine NF- κ B-Aktivierung zu einer systemischen Inflammation führen, konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl auf RNA-Ebene als auch mittels Immunhistochemie gezeigt werden: So konnte eine 180-fach erhöhte Expression von TNF- α und eine 21-fache Hochregulation der COX-2 im Myokard beobachtet werden, welche sich in der histologischen Untersuchung in jeweils signifikant

erhöhten Anteilen an positiv gefärbten Zellen äußerte. Die Zytokine IL-1 β und IL-6 wiesen eine nur geringfügig gesteigerte Expression auf (IL-1 β : 2,8-fach; IL-6: 1,3-fach).

Die systemische Inflammation, welche infolge dieser verstärkten Zytokin-Ausschüttung entsteht, fördert zum einen die endotheliale Dysfunktion der Gefäße und die Entwicklung von Arteriosklerose (Ross 1999), zum anderen führt sie zur erneuten Induktion des NF- κ B-Signalweges, was die Entzündungsreaktion weiter verstärkt (Ghosh et al. 1998).

Das Zytokin TNF- α konnte außerdem mit einer Hemmung des Komplexes I der Atmungskette in den Mitochondrien assoziiert werden (Higuchi et al. 1998), was im folgenden Kapitel näher erläutert wird.

4.4 Auswirkungen von CIH auf kardiale Fibrosierung und Hypertrophie

Ein sogenanntes kardiales Remodeling geht mit molekularen, interstitiellen und zellulären Veränderungen des Herzens einher, die sich vor allem nach akutem Myokardinfarkt, Druck- und Volumenbelastung oder Entzündung manifestieren können (Gajarsa und Kloner 2011; Frangogiannis 2014). Die Umbauprozesse des Herzens sind zunächst als Heilungs- und Anpassungsvorgänge anzusehen, die gekennzeichnet sind durch interstitielle Fibrose, Myozytenhypertrophie, apoptotischen Kardiomyozytenverlust und Dilatation des Ventrikels (Sutton und Sharpe 2000; Bauersachs und Ertl 2006). Die zugrundeliegenden Pathomechanismen sind in Abbildung 43 schematisch dargestellt.

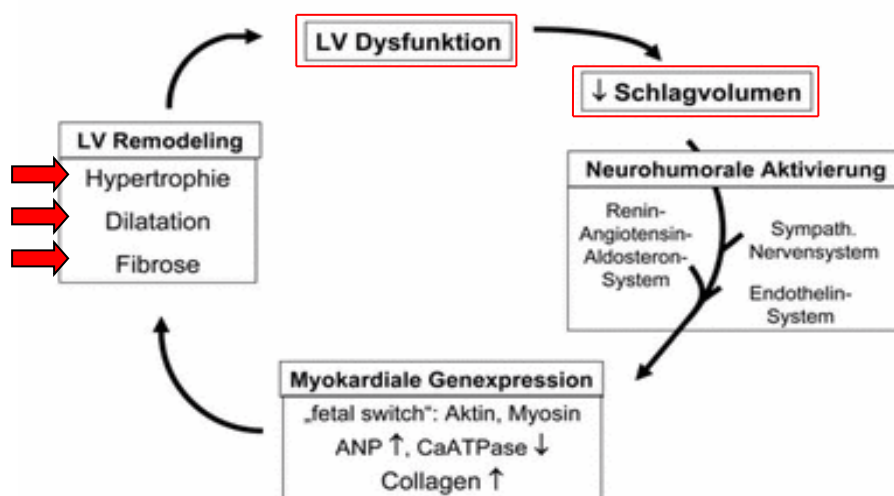


Abbildung 43: Schematische Darstellung der Pathomechanismen des linksventrikulären Remodelings

Eine Einschränkung der linksventrikulären Funktion geht mit einem verminderten Schlagvolumen einher, was zu einer Aktivierung von Sympathikus und RAAS führt. Es kommt zur Hypertrophie, Dilatation und Fibrosierung des Myokards. Diese Mechanismen sind unabhängig von hypoxischen Zuständen (Bauersachs und Ertl 2006, modifiziert).

Infolge einer kardialen Schädigung reduziert sich die Auswurfleistung des Herzens, wodurch es zur Aktivierung des Sympathikus, des RAAS und des Endothelin-Systems kommt. Dies führt über eine Vasokonstriktion zur Erhöhung des Blutdrucks, der das Herz mit einer Steigerung der Herzfrequenz und Kontraktilität begegnet. Dieser Kompensationsmechanismus führt langfristig zu einer ventrikulären Hypertrophie aufgrund einer Größenzunahme der Kardiomyozyten.

Die RAAS-Aktivierung induziert über eine erhöhte Aldosteron-Konzentration außerdem die Synthese von Kollagen, was zur interstitiellen Fibrosierung führt. Dies erhöht das Risiko für die Entwicklung kardialer Arrhythmien, schränkt die Relaxationsfähigkeit des Ventrikels in der Diastole ein und kann auf diese Weise zur Entstehung einer systolischen und diastolischen Herzinsuffizienz führen (Sutton und Sharpe 2000; Bauersachs und Ertl 2006).

Die Daten von Frau Dr. Simone Kraut lassen vermuten, dass die kardiale Schädigung im vorliegenden Mausmodell am ehesten aus der erhöhten Nachlast infolge der arteriellen Hypertonie resultiert. So konnte sie zeigen, dass die CIH-Exposition zu einem kontinuierlichen und signifikanten Anstieg des systolischen und diastolischen Blutdrucks der Tiere führt (Dissertation Kraut 2014). Während zu Beginn des Experiments die Blutdruckwerte der CIH-Mäuse im Durchschnitt bei 120 mmHg systolisch und 90 mmHg diastolisch lagen, wurde am Ende der sechswöchigen CIH-Exposition ein Anstieg auf 127 mmHg systolisch und 104 mmHg diastolisch gemessen. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) der CIH-Tiere erhöhte sich somit von 100 mmHg zu Beginn der Beobachtung auf 113 mmHg am Ende des Versuches. Bei den normoxischen Mäusen hingegen zeigten sich keine Veränderungen des Blutdrucks (MAP 1. Woche: 99 mmHg; 6. Woche: 100 mmHg) (Dissertation Kraut 2014). Der in zahlreichen Studien gesehene OSAS-assoziierte Anstieg des Blutdrucks (siehe 1.2.2) kann somit durch Frau Dr. Simone Krauts Ergebnisse ebenfalls bestätigt werden.

Arterielle Hypertonie kann infolge der erhöhten Nachlast über längere Zeit zur Entwicklung einer konzentrischen Hypertrophie führen (siehe 1.3.2.2) (Hedner et al. 1990; Kraiczi et al. 2001; Chami et al. 2008; Aslan et al. 2013). Frau Dr. Simone Krauts Daten hinsichtlich des linken Ventrikels zeigten keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe (Dissertation Kraut 2014). Eine signifikante Linksherzhypertrophie, die angesichts der Hypertonie der Tiere und bisheriger Daten von OSAS-Patienten hätte erwartet werden können, wurde in diesem Maus-Modell nicht bestätigt.

Allerdings konnte Frau Dr. Simone Kraut zeigen, dass die sechswöchige CIH-Exposition mit einer pulmonalen Hypertonie einhergeht und zu einer signifikanten Rechtsherzhypertrophie der Tiere führt (Dissertation Kraut 2014). Zur Eruierung der pulmonalen Hypertonie bestimmte sie den systolischen rechtsventrikulären Blutdruck, welcher sich in der Versuchsgruppe mit $25,5 \pm 0,5$ mmHg im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $23,4 \pm 0,5$ mmHg als signifikant erhöht erwies. Die Rechtsherzhypertrophie wurde zum einen anhand der Ratio des Nassgewichtes von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum ($RV/(LV+S)$) gemessen, zum anderen mittels des Verhältnisses von rechtem Ventrikel zu Körpergewicht, wobei in beiden Fällen signifikant erhöhte Werte festgestellt werden konnten (Dissertation Kraut 2014).

Das Phänomen der Rechtsherzhypertrophie konnte bereits in einigen Maus-Modellen der CIH (Fagan 2001; Campen et al. 2005) und der chronisch konstanten Hypoxie (CCH) (Fan et al. 2005) beobachtet werden und wird durch eine hypoxiebedingte Vasokonstriktion der pulmonalen Gefäße und vaskuläres Remodeling verursacht (Campen et al. 2005;

Dissertation Kraut 2014). Auch in Frau Dr. Simone Krauts Arbeit erfolgte die Beurteilung des Remodelings anhand einer morphometrischen Analyse des Muskularisierungsgrades der pulmonalen Gefäße, wobei ein signifikant höherer Anteil an Teil- und Vollmuskularisierung bei den CIH-exponierten Tieren detektiert werden konnte (Dissertation Kraut 2014). So zeigten sich bei den KON-Mäusen 28% der kleinen Lungengefäße teil- und 8% vollmuskularisiert, während sich bei den CIH-Mäusen 57% teil- und 19% vollmuskularisierte Gefäße beobachten ließen. Die Folge dieser vaskulären Veränderungen ist eine Erhöhung der rechtsventrikulären Nachlast, was zur kompensatorischen Hypertrophie des rechten Ventrikels führt (Silbernagl und Despopoulos 2012; Dissertation Kraut 2014). Während das OSAS beim Menschen meist mit einer linksventrikulären Hypertrophie einhergeht und auch der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung des linksventrikulären Myokards liegt, kann im Maus-Modell in vielen Fällen nur eine Rechtsherzhypertrophie detektiert werden. Ein Erklärungsansatz dafür kann darin gesehen werden, dass die OSAS-typische Obstruktion der oberen Atemwege im Maus-Modell nicht simuliert werden kann und somit auch die intrathorakalen Druckschwankungen nicht nachgestellt werden können (Dissertation Kraut 2014), wobei laut Damy et al. jedoch die linksventrikuläre Hypertrophie beim Menschen vor allem durch diesen Pathomechanismus begünstigt wird (Damy et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte der rechte Ventrikel aufgrund fehlenden Gewebes nicht untersucht werden, was jedoch angesichts der Datenlage nachgeholt werden sollte.

Auch die weitere Erforschung des Maus-Modells der CCH erweist sich als interessant. Während Campen et al. in der intermittierenden Hypoxie den Stimulus für die rechtsventrikuläre Hypertrophie sehen (Campen et al. 2005), untersuchten Fan et al. anhand eines neonatalen Mausmodells die Auswirkungen von CCH und CIH auf das Myokard (Fan et al. 2005). Unter CCH zeigte sich eine rechtsventrikuläre Hypertrophie sowie eine Vergrößerung des Herzens, während dieses Ergebnis unter CIH nicht detektiert werden konnte. Das lässt vermuten, dass die myokardialen Veränderungen hinsichtlich einer Hypertrophie-Entwicklung, ähnlich wie bei der Kapillarneubildung, von der Dauer der Hypoxie abhängig sind. Auch die Ergebnisse von Ito et al. können diese Hypothese stützen (Ito et al. 1996): sie konnten in einem Modell von neonatalen Ratten die Entwicklung einer Hypertrophie unter milder Hypoxie (10% O₂) nachweisen, wobei der Hypertrophie-Marker skeletal α -actin bereits in den ersten 24 Stunden der Hypoxie-Exposition hochreguliert wurde und die Zelloberfläche der Kardiomyozyten nach 48 Stunden Hypoxie-Exposition um das 1,6-fache gegenüber der Kontrollgruppe zunahm. Schwere Hypoxie hingegen (0% O₂) führte zu degenerativen morphologischen Veränderungen und einer Abnahme der Zellzahl,

was die Toxizität von schwerem Sauerstoffmangel auf Kardiomyozyten verdeutlicht und als Erklärungsansatz für die Abnahme des Herzgewichts und der Herzgröße infolge Verstärkung der Hypoxie (7,5% O₂ anstatt 11% O₂) im Mausmodell von Fan et al. dienen kann (Fan et al. 2005).

In unserem Maus-Modell kam es trotz vorliegender Rechtsherzhypertrophie nicht zu einer Veränderung des Herzgewichts (Dissertation Kraut 2014).

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der zugrundeliegenden histomorphologischen und molekularbiologischen Mechanismen am linksventrikulären Myokard, wobei auch im Zusammenhang mit kardialen Remodeling die Notch-Proteinfamilie betrachtet und die Bedeutung der PMCA4 hinsichtlich der Hypertrophie-Entwicklung eruiert werden sollte.

Notch1 und 3

Notch spielt eine wichtige Rolle bei der Zellregeneration nach kardialen Schäden (siehe 1.3.2.1 und 4.2). So konnten Gude et al. zeigen, dass eine erhöhte Notch1-Expression der Kardiomyozyten nahe der Grenze eines akuten Myokardinfarktes mit einer verminderten Apoptose und einer verstärkten Aktivität des Proteins Akt einhergeht (Gude et al. 2008), welches auch als Proteinkinase B bekannt ist und wichtige Funktionen hinsichtlich Proliferation, Differenzierung und Stoffwechsel von Zellen einnimmt (Manning 2005). Außerdem ist Notch1 an der Differenzierung von kardialen Vorläuferzellen zu Kardiomyozyten beteiligt (Urbanek et al. 2010), wobei eine Hemmung des Signalweges mit einer gesteigerten Apoptose bei hypertensiven Mäusen (Croquelois et al. 2008) und der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie in Verbindung gebracht werden konnte (Urbanek et al. 2010). Auch jüngere Studien lieferten ähnliche Ergebnisse (Kratsios et al. 2010; Yu und Song 2014), sodass Notch eine wichtige Funktion hinsichtlich der Regeneration von Kardiomyozyten im Rahmen von kardialen Schädigungen zugeschrieben werden kann. Die Aktivierung von Notch1 reduziert somit das pathologische kardiale Remodeling durch ein erhöhtes Zellüberleben der Kardiomyozyten, Stimulierung der kardialen Stammzellen zur Differenzierung in Kardiomyozyten statt Fibroblasten und Induzierung der Angiogenese (Rizzo et al. 2014).

Die in unserem Versuch 5,4-fach erhöhte Expression von Notch1 im linksventrikulären Myokard von CIH im Vergleich zur KON-Gruppe könnte demnach als Erklärungsansatz für den geringen Kollagengehalt der Myokardfasern und fehlende linksventrikuläre Hypertrophie verstanden werden. Auch die Ergebnisse von Nemir et al. können diese Hypothese stützen, da sie die Schlüsselrolle des Notch1-Signalweges bezüglich der

Regeneration des geschädigten Herzens in der Erhaltung des Gleichgewichts von fibrotischen und regenerativen Prozessen durch Modulation mesenchymaler Stromazellen sehen (Nemir et al. 2014). Außerdem konnten sie zeigen, dass Notch1 die Entwicklung von Hypertrophie und TGF- β /CTGF-vermittelter kardialer Fibrose infolge Druckbelastung inhibiert.

Bezüglich der Notch-Isoform 3 können in der Literatur vielfältige Informationen gefunden werden. So wird es von glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert und ist gemeinsam mit seinem Liganden Jagged1 an der Genese der altersbedingten Intima- und Mediaverdickung beteiligt (Wu et al. 2011). Außerdem konnte in einem in vitro-Experiment gezeigt werden, dass die Aktivierung von Notch1 und Notch3 neben einer gesteigerten Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen auch mit einer Hemmung von deren Apoptose einhergeht (Sweeney et al. 2004). In Interaktion mit Angiotensin II trägt Notch3 durch Stimulation von Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen zur Progression des vaskulären Remodelings bei (Ozasa et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden die Gefäße und mögliche arteriosklerotische Veränderungen leider nicht untersucht, sodass die in unserem Maus-Modell festgestellte 7,1-fache Hochregulation von Notch3 in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht hinreichend gedeutet werden kann.

Laut Gude et al. geht eine Notch-Überexpression auch mit einer verbesserten hämodynamischen Funktion des Herzens einher (Gude et al. 2008), was sich in unserem Projekt allerdings nicht bestätigen ließ. Es kann angenommen werden, dass an der Genese der CIH-assoziierten Pathologika noch weitere Moleküle und Prozesse beteiligt sind.

PMCA4

Bei den PMCAs handelt es sich um Transmembranproteine, von welchen vier verschiedene Isoformen (PMCA1-4) existieren. Während PMCA1 und 4 ubiquitär exprimiert werden, sind PMCA2 und 3 an bestimmte Zellen und Gewebe gebunden (Holton et al. 2010). Die für das Herz besonders bedeutsame PMCA4 transportiert als hochaffine Ca^{2+} -Pumpe das Calcium aus dem Zytosol der Kardiomyozyten in den Extrazellularraum und sorgt auf diese Weise für die intrazelluläre Homöostase der Kardiomyozyten (Carafoli 1994). Durch alternatives Spleißen können zwei Spleißvarianten generiert werden: PMCA4a und PMCA4b. Während die PMCA4a ein Exon mit 190 (Maus)- Nukleotiden beinhaltet, besitzt die PMCA4b dieses Exon nicht. Das Protein PMCA4b ist länger als die PMCA4a und hat eine PDC-Bindungsstelle, über welche das Protein mit nNOS interagieren kann. Calcineurin hingegen bindet an einen bei beiden Spleißvarianten vorhandenen intrazellulären Loop zwischen den Transmembranregionen 4 und 5 (Strehler und Zacharias 2001; Holton et al. 2010).

Die Bedeutung der PMCA4 für die diastolische Relaxation des Ventrikels wird als gering eingeschätzt; vielmehr werden ihr Funktionen der Signalübertragung zugesprochen, im Besonderen die Regulation anderer Ca^{2+} -abhängiger Moleküle wie z.B. der Phosphatase Calcineurin und der nNOS (Oceandy et al. 2008; Wu et al. 2009). Dies geschieht, indem die PMCA aufgrund des aus der Zelle heraus gerichteten Ca^{2+} -Transports für eine lokal sehr niedrige intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration sorgt, wodurch die Ca^{2+} -abhängigen Interaktions-Proteine an dieses Milieu gebunden werden. Diese Interaktion führt zu einer Herunterregulation der Aktivität dieser Enzyme (Holton et al. 2010). Eine verminderte Tätigkeit von Calcineurin geht mit einer Hemmung des Calcineurin/NF-AT3-Signalweges einher, welchem unter anderem eine Relevanz bei der Entstehung myokardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz zugeschrieben wird (Molkentin et al. 1998; Holton et al. 2007; Holton et al. 2010).

Wie bereits in Kapitel 1.3.2.2 beschrieben wurde, führt eine Dehnung der Kardiomyozyten infolge Druckbelastung, wie sie beispielsweise im Rahmen der arteriellen Hypertonie auftritt, zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Dies aktiviert Calcineurin, welches den Transkriptionsfaktor NF-AT3 phosphoryliert und dessen Translokation in den Zellkern ermöglicht. Dort induziert NF-AT3 die Expression weiterer Transkriptionsfaktoren, was eine Größenzunahme der Kardiomyozyten und eine gesteigerte Proteinsynthese zur Folge hat (Molkentin et al. 1998). Zur kardialen Hypertrophie kommt es schließlich infolge einer dauerhaften Aktivierung dieses Signalweges, welcher auch an der Entwicklung und Differenzierung von T-Zellen, β -Zellen, Osteoblasten, Axonen, Skelettmuskeln und Herzklappen beteiligt ist (Holton et al. 2010). Jüngste Studien konnten dem Calcineurin/NF-AT3-Signalweg sogar eine Mediator-Rolle bezüglich der VEGF-vermittelten Angiogenese zuschreiben (Baggott et al. 2014). Dabei führt die Hemmung des Calcineurin/NF-AT3-Signalweg durch die PMCA4 zu einer verminderten Kapillarneubildung.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich die linksventrikuläre Expression der PMCA4b auf RNA-Ebene bei den CIH-exponierten Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren 69-fach erhöht. Frau Dr. Simone Kraut konnte im Rahmen ihres Projektes jedoch nur eine signifikante Rechtsherzhypertrophie beobachten, während der linke Ventrikel keine Hypertrophie-Zeichen aufwies und auch das Herzgewicht unverändert blieb (Dissertation Kraut 2014).

Ein bezüglich des linken Ventrikels ähnliches Ergebnis erhielten Wu et al. bei der Untersuchung der Auswirkungen einer PMCA4b-Überexpression mittels Maus-Modell (Wu et al. 2009). Sie konnten zeigen, dass eine PMCA4b-Überexpression mit einer Verminderung der Entwicklung von kardialer Hypertrophie und Fibrose infolge

Druckbelastung (mittels Verengung der Aorta, transverse aortic constriction, TAC) einhergeht. Ein Knockout des Gens hingegen führte unter gleichen Bedingungen bereits nach kurzer Zeit zur signifikanten Hypertrophie und Dekompensation (Wu et al. 2009).

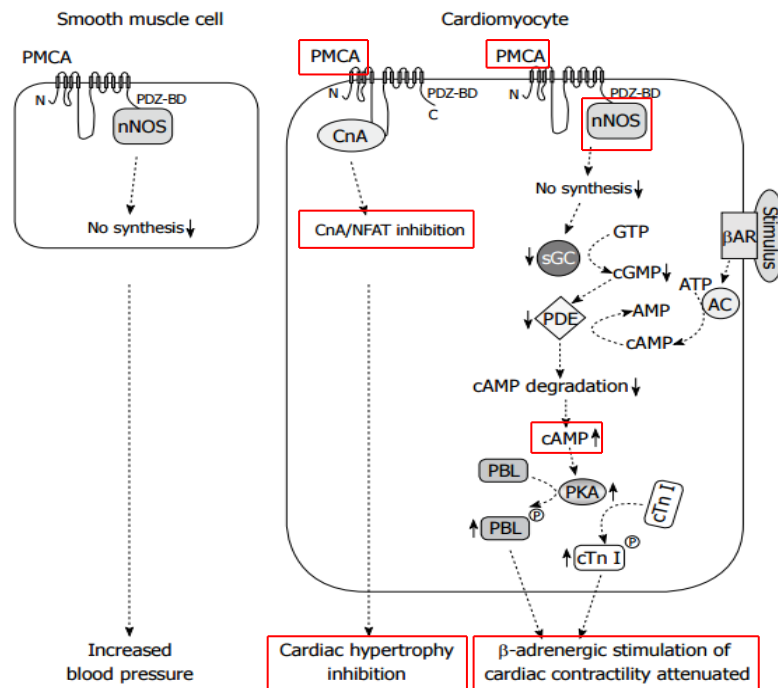


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Interaktionen der PMCA

In glatten Gefäßmuskelzellen verursacht die PMCA über eine verminderte nNOS-Synthese eine Blutdruck-Erhöhung. Am Kardiomyozyt führt die verminderte nNOS-Synthese über eine cAMP-Erhöhung zur Steigerung der kardialen Kontraktilität. Außerdem verhindert die PMCA-vermittelte Inhibition des Calcineurin/NFAT-Signalweges die Entwicklung einer Hypertrophie (Holton et al. 2010, modifiziert).

Doch es existieren gegensätzliche Daten hinsichtlich der Bedeutung der PMCA4b für Hypertrophie-Entwicklung: Oceandy et al. beobachteten unter PMCA4b-Überexpression eine verminderte Kontraktilität des Myokards infolge β -adrenerger Stimulation und detektierten eine signifikante Zunahme des Ratios Herzgewicht/Körpergewicht der Mäuse (Oceandy et al. 2007). In einem weiteren Experiment mit PMCA4b-Knockout-Tieren zeigte sich eine geringere Myokardhypertrophie infolge TAC-Druckbelastung im Vergleich zu den WT-Kontrolltieren (Oceandy et al. 2008).

Die Rolle der PMCA4b für das Myokard bleibt angesichts dieser gegensätzlichen Daten zunächst unklar. Außerdem ist die PMCA4 neben den Kardiomyozyten auch in glatten Gefäßmuskelzellen zu finden (Afroze et al. 2014). Ob die 69-fache Hochregulation der PMCA4b in unserem Experiment durch eine erhöhte Expression des Proteins in den Kardiomyozyten oder in den glatten Muskelzellen der myokardialen Gefäße verursacht

wurde, kann nicht differenziert werden und bleibt somit unklar. Diese Tatsache sowie die gegensätzliche Studienlage verdeutlichen den bestehenden Forschungsbedarf.

Während die Bedeutung der PMCA4b für das Herz bereits vielfach untersucht wurde, lassen sich in der Literatur zur Rolle der Isoform 4a nur wenige Informationen finden, wobei diese vorrangig auf Pathologika der Geschlechtsorgane und Spermien beschränkt sind (Al-Dossary et al. 2013).

Afroze et al. untersuchten die Rolle der PMCA4 und ihrer verschiedenen Spleißvarianten im Rahmen des Zellzyklus der Gefäßmuskelzellen und konnten beobachten, dass sich das Verhältnis der Expression von PMCA4a und 4b, welches normalerweise ausgeglichen ist, während der Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen zugunsten der PMCA4b verschiebt. Diese Überexpression führt über die PMCA4b-vermittelte Hemmung der nNOS zu einer Vasokonstriktion, was eine Erhöhung des Blutdrucks zur Folge hat. Den beiden Spleißvarianten können somit unterschiedliche Bedeutungen für den Zellzyklus der glatten Gefäßmuskelzellen beigemessen werden (Afroze et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte die PMCA4a nicht einzeln untersucht werden, da die beiden verwendeten Primer wie oben beschrieben entweder PMCA4b oder beide Spleißvarianten PMCA4a/b erkannten. Die RNA-Expression der PMCA4a/b zeigte sich 17-fach hochreguliert, was angesichts der 69-fach gesteigerten Expression der PMCA4b merkwürdig erscheint. Als mögliche Erklärungsansätze für die unterschiedlichen Ergebnisse kommen in Betracht, dass der PMCA4a/b erkennende Primer nicht richtig bindet, bzw. dass im Myokard größtenteils PMCA4b vorhanden ist und die Spleißvariante PMCA4a nur eine sehr untergeordnete Rolle spielt.

SOCS3

In der vorliegenden Arbeit konnte in der CIH-Gruppe eine 83-fach höhere SOCS3-Expression auf RNA-Ebene im Vergleich zur KON-Gruppe detektiert werden, was eine Beteiligung des Proteins an den inflammatorischen Vorgängen im Rahmen des OSAS vermuten lässt. Dem Faktor wird aufgrund seiner Interaktion mit dem kardioprotektiven JAK-STAT-Signalweg eine zentrale Rolle in der Entwicklung von Hypertrophie und Herzinsuffizienz zugeschrieben.

Aktiviert wird der JAK-STAT-Signalweg physiologischerweise durch die Bindung verschiedener Zytokine an JAK, was infolge Phosphorylierung und Dimerisierung die Translokation der STAT-Transkriptionsfaktoren in den Zellkern ermöglicht und dort die Expression von für Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellüberleben zuständigen Genen induziert. Die Bindung von SOCS3 an JAK hingegen führt zur Hemmung dieses

Signalweges, was mit gesteigerter Inflammation, Fibrose und Apoptose einhergeht und auf diese Weise die Entwicklung von kardialen Remodeling begünstigen kann (Yasukawa et al. 2012; Carow und Rottenberg 2014). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass SOCS3 an der Entwicklung von Arteriosklerose beteiligt ist (Liang et al. 2013). Ein Gen-Knockout von SOCS3 hingegen führt neben der Hochregulation der kardioprotektiven Signalwege STAT3 und AKT zu einer Verminderung des kardialen Remodelings und einer Reduktion von Inflammation und Apoptose (siehe Abbildung 6). Als Ursache für verminderte Apoptose-Vorgänge kann die infolge des SOCS3-Knockouts herabgesetzte Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien gesehen werden (Oba et al. 2012). Eine Überexpression von SOCS3 hingegen kann über eine Calcineurin-vermittelte mitochondriale Schwellung mit daraus resultierender mitochondrialer Dysfunktion verursachen (Lebrun et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit führte die CIH zu einer 83-fach gesteigerten Expression von SOCS3, wobei in der Literatur zu SOCS3 und Hypoxie ähnliche Ergebnisse gefunden werden können. So beschreiben Bai et al. SOCS3 als ein durch Hypoxie rasch induzierbares Gen, dessen Expression sich im Zellkulturversuch glatter Gefäßmuskelzellen bereits zwei Stunden nach Hypoxie-Exposition erhöhte und eine Verminderung der ebenfalls Hypoxie-induzierten und JAK-STAT3-vermittelten Proliferation dieser Gefäßmuskelzellen bewirkte (Bai et al. 2006). Auch Gu et al. untersuchten den Effekt von Hypoxie auf die Expression von SOCS3, STAT3 und dem für myokardiale Kompensationsmechanismen bedeutsamen Transkriptionsfaktor NF- κ B im Myokard von Kindern mit zyanotischem Herzfehler und hypoxischen H9c2-Zellen, wobei in beiden Fällen eine Hochregulation von SOCS3 detektiert werden konnte (Gu et al. 2011). Analog zu den Ergebnissen von Bai et al. wiesen Gu et al. ebenfalls nach, dass eine SOCS3-Überexpression mit einer verminderten Aktivität des JAK-STAT3-Signalweges einhergeht. Dies verdeutlicht erneut die ausschlaggebende Rolle des Proteins hinsichtlich der Modulation der STAT3-vermittelten kardioprotektiven Prozesse. Diese ist laut Gu et al. insbesondere für die Anpassungsvorgänge des Myokards an chronische Hypoxie von Bedeutung, da SOCS3 unter Stressbedingungen zusätzlich sich überschneidende Zellsignale zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT3 reguliert (Gu et al. 2011).

Eine signifikante Suppression des SOCS3-Gens hingegen konnten Ma et al. im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung des Myokards beobachten. Dabei handelt es sich um kurze ischämische Perioden (3 Minuten), die von einer Reperfusion gefolgt sind und die Kardiomyozyten vor einer darauffolgenden deletären Ischämie schützen können. Doch

nicht nur SOCS3 zeigte sich herunterreguliert; auch die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 sowie der Apoptose-Marker Caspase 3 wiesen eine reduzierte Genexpression auf (Ma et al. 2013). Anhand dieser Ergebnisse kann die Abhängigkeit der molekularbiologischen Veränderungen und damit verbunden auch der kardialen Schädigung von der Dauer der Hypoxie verdeutlicht werden. Während kurze, nur wenige Minuten andauernde Hypoxie-Episoden über eine Herunterregulation inflammatorischer und apoptotischer Signale protektiv auf das Myokard wirken, induziert chronische Hypoxie eine systemische Entzündungsantwort und den programmierten Zelltod.

Mitochondrien

Im Rahmen des programmierten Zelltods spielen die Mitochondrien eine zentrale Rolle. Die Hauptenergielieferanten der Zelle sind neben der ATP-Produktion durch oxidative Phosphorylierung außerdem an Prozessen der Zellproliferation und Apoptose, aber auch am Pyrimidin-, Aminosäure-, Häm- und Steroidmetabolismus beteiligt (Bereiter-Hahn 1990; Jakobs 2004; Eirin et al. 2014). Diese vielfältigen Funktionen können die Zellorganellen dank ihrer besonderen Struktur gewährleisten: die Mitochondrien sind umgeben von einer äußeren Mitochondrienmembran, welche in ihrem Aufbau anderen Membranen ähnelt und Moleküle bis zu 5kD Molekulargewicht über erleichterte Diffusion passieren lässt (Chayen 1993). Zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran schließt sich der Intermembranraum an, in welchem pro-apoptotische Enzyme wie z.B. Caspasen und Cytochrom c lokalisiert sind. Die Innenmembran umschließt den Matrixraum, in welchem die essentiellen Stoffwechselprozesse wie der Citratzyklus, die β -Oxidation und Teile des Harnstoffzyklus stattfinden, und enthält die Enzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette. Je nach Stoffwechselaktivität der jeweiligen Zelle ist die innere Mitochondrienmembran mehr oder weniger stark gefaltet, wobei diese als Cristae bzw. Tubuli bezeichnete Faltung eine Oberflächenvergrößerung bewirkt und auf diese Weise eine enorme Steigerung der mitochondrialen Transport- und Synthesevorgänge ermöglicht (Bereiter-Hahn 1990; Chayen 1993). Hinsichtlich des Lebenszyklus stellen Mitochondrien komplexe und dynamische Organellen dar, die ihre Morphologie durch Zerteilung (Fission) und Verschmelzung (Fusion) verändern können. Die Fission dient der Vermehrung der Mitochondrien und somit auch deren Vererbung, wobei Außen- und Innenmembran verschiedene und voneinander unabhängige Zerteilungsmechanismen aufweisen (Labrousse et al. 1999, Meuer 2007). Während die Zerteilung der Innenmembran durch das Protein Mdm33 gesteuert wird (Messerschmitt et al. 2003), sind an der Zerteilung der Außenmembran die Proteine *dynamamin related protein* (Drp1) und *mitochondrial fission*

(Fis1) beteiligt (Smirnova et al. 1998; Labrousse et al. 1999; Sesaki und Jensen 1999). Fis1 ist ein integrales Protein der äußeren Mitochondrienmembran und bindet Drp1, welches die Durchschnürung des Mitochondriums und somit den Zerteilungsprozess vermittelt (Mozdy et al. 2000; Shaw und Nunnari 2002; Tieu et al. 2002). Die Fusion von Mitochondrien dient der Erhaltung und Rekombination des Genoms sowie der Verhinderung frühzeitiger Zellalterung (Ono et al. 2001). Die verantwortlichen Proteine Mitofusin 1 (Mfn1) und Mitofusin 2 (Mfn2) sind ebenfalls in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Hales und Fuller 1997) und werden durch eine Verringerung des Membranpotenzials zur Fusion stimuliert. Auf diese Weise können geschädigte Mitochondrien durch eine Verschmelzung mit intakten gerettet werden (Honda et al. 2005). Mfn1 und Mfn2 initiieren durch Andocken an ein anderes Mitochondrium den Fusionsvorgang (Fritz et al. 2001), während die im Intermembranraum befindlichen *optic atrophy 1* (OPA1)-Komplexe an der Cristae-Bildung und Verschmelzung der inneren und äußeren Mitochondrienmembran beteiligt sind (Pelloquin et al. 1998; Delettre et al. 2000; Olichon et al. 2003; Bossy-Wetzel et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie die Mitochondrien bezüglich ihrer Größe, ihrer Dichte im Myokard (Anzahl pro Fläche) und ihrer Integrität analysiert. Die hinsichtlich der Integritäts-Untersuchung festgelegten Kriterien sind unter Punkt 2.2.5.4 aufgeführt und begründen sich in der Annahme, dass für die Funktionstüchtigkeit eines Mitochondriums sowohl die innere als auch die äußere Mitochondrienmembran - zumindest zum Großteil - erhalten sein müssen. Wie bereits in Kapitel 1.3.3 erwähnt, kommt es infolge eines apoptotischen Stimulus zur Permeabilitätssteigerung der mitochondrialen Membranen mit Verlust des für die Atmungskette essentiellen Transmembranpotentials und zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies sowie toxischer Proteine. Ein in der Mitochondrienmembran gelegener Na^+/H^+ -Antiporter (*sodium/proton exchanger*, NHE1) transportiert Wasserstoffionen (H^+) im Austausch gegen Natriumionen (Na^+) in das Innere des Mitochondriums und führt, einhergehend mit einem Calcium (Ca^{2+})-Einstrom in das Zellorganell, zu einem Öffnen der MPT-Pore. Es kommt zum Einstrom von Flüssigkeit in das Mitochondrium und zur Matrixschwellung. Dies resultiert letztendlich in der Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran, infolgedessen es über die Freisetzung pro-apoptotischer Enzyme in der Regel zum programmierten Zelltod der gesamten Zelle kommt (Zoratti und Szabo 1995; Green und Reed 1998; Crompton 1999; Zamzami und Kroemer 2001; Teshima et al. 2003; Alvarez und Villa-Abrille 2013; Wang et al. 2015).

Da in der Literatur bisher keine vergleichbaren Analysen durchgeführt wurden und somit keine gebräuchlichen Kriterien für die elektronenmikroskopische Beurteilung der

mitochondrialen Funktion existieren, erfolgte die Auswertung in der vorliegenden Arbeit nach dem unter Punkt 1.3.3 erläuterten Schema. Die nachfolgenden Abbildungen sollen exemplarisch verdeutlichen, wie sich die zuvor erläuterten Vorgänge, welche im Rahmen der Apoptose im Mitochondrium ablaufen, in der Elektronenmikroskopie darstellen.

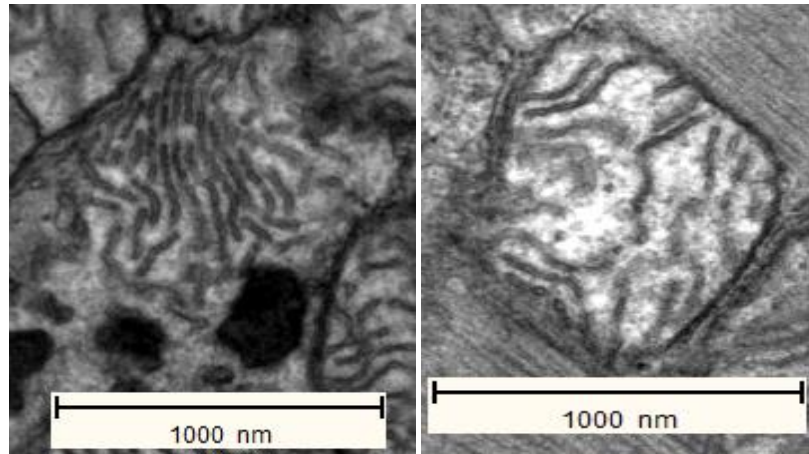


Abbildung 45: Beispiele für beschädigte Mitochondrien

Rupturierte äußere Mitochondrienmembran (links) und Schwellung der Mitochondrien-Matrix (rechts), 16.000-fache Vergrößerung

Bei Betrachtung der Dichte der Mitochondrien konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen detektiert werden. Es zeigten sich pro $40 \mu\text{m}^2$ Myokard durchschnittlich 30 (KON-Mäuse) bzw. 32 Mitochondrien (CIH-Mäuse), wobei diese mit ca. 50% einen hohen Anteil der Gesamtfläche des Myokards ausmachten. Dieses Ergebnis kann die in der Literatur vielfach beschriebene hohe Mitochondrien-Dichte im Myokard bestätigen (Jakobs 2004; Eirin et al. 2014).

Die durchschnittliche Mitochondrien-Größe lag bei $0,66 \mu\text{m}^2$ (KON-Mäuse) bzw. $0,65 \mu\text{m}^2$ (CIH-Mäuse), sodass hier kein Unterschied zwischen den KON- und CIH-exponierten Tieren feststellbar ist. Dabei sind Anschnitte von Mitochondrien mit eingerechnet, die nicht den maximalen Querschnitt repräsentieren.

Hinsichtlich der Integrität der Mitochondrien konnten jedoch signifikante Unterschiede detektiert werden: So zeigte sich der Anteil der als intakt beurteilten Mitochondrien bei den CIH-exponierten Mäusen mit 63% signifikant erniedrigt gegenüber den unter Normoxie gehaltenen Tieren (72%). Der Anteil an defekten Mitochondrien war in der CIH-Gruppe mit 37% dementsprechend signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (28%) erhöht. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass CIH zu verstärkten Apoptose-Vorgängen und möglicherweise mitochondrialer Dysfunktion führt, welche zu der Entwicklung einer OSAS-assoziierten Herzinsuffizienz beitragen könnten. Die Integrität der Mitochondrien wird in der

vorliegenden Arbeit mit der Qualität der mitochondrialen Ultrastruktur definiert. Um eine einwandfreie funktionelle Integrität eines Mitochondriums beschreiben zu können, sollte jedoch in weiteren Projekten auch der fehlende Austritt von Cytochrom c nachgewiesen werden.

Zur Hypothese der verstärkten Apoptose-Vorgänge passen die enorme Hochregulation des apoptotisch wirksamen Enzyms Caspase3 (88-fach) sowie die geringfügig gesteigerte Expression des pro-apoptotischen Markers Bax (1,4-fach), was eine mögliche Folge der SOCS3-Überexpression sein kann (Oba et al. 2012). Doch auch die Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 zeigt sich 7,7-fach erhöht, was mit der Hochregulation von Notch1 in Zusammenhang stehen könnte (Rizzo et al. 2014). Sowohl Bcl-2 als auch Bax sind neben dem spannungsabhängigen Anionenkanal (VDAC) an der Formation der in Kapitel 1.3.3 bereits erwähnten MPT-Pore beteiligt, deren Öffnung (z.B. infolge Ca^{2+} -Überladung) einen Zusammenbruch des Transmembranpotentials und somit den Untergang des Mitochondriums zur Folge hat. Die dauerhafte Aktivierung der MPT-Pore kann zum nekrotischen Zelltod führen, während der Hemmung der MPT-Pore kardioprotektive Effekte zugeschrieben werden konnten (Halestrap 2010). Untersuchungen zeigten, dass eine NHE1-Inhibierung und die damit einhergehende H^+ -Akkumulation außerhalb des Mitochondriums mit einer reduzierten MPT-Poren-Öffnung unter Stressbedingungen einhergehen (Karmazyn et al. 1988; Kusumoto et al. 2001; Wang et al. 2003; Fantinelli et al. 2006), was wiederum mit einer signifikant geringeren Ca^{2+} -induzierten Mitochondrienschwellung assoziiert ist (Villa-Abrille et al. 2011).

Infolge der Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran kommt es zur Freisetzung pro-apoptotischer Moleküle wie z.B. Procaspasen und Cytochrom c. Die im vorliegenden Experiment enorm gesteigerte Expression der Caspase3 verdeutlicht die verstärkten Apoptose-Vorgänge, welche möglicherweise als Erklärung für das unveränderte Herzgewicht der CIH-exponierten Tiere trotz bestehender Rechtsherzhypertrophie angesehen werden können.

Doch auch das Zytokin $\text{TNF-}\alpha$ kann Apoptose-Vorgänge initiieren. Untersuchungen zeigten, dass das Protein den Komplex I der Atmungskette inhibiert und auf diese Weise den mitochondrialen Permeabilitätsübergang und die Freisetzung von Cytochrom c induzieren kann (Higuchi et al. 1998). Der $\text{TNF-}\alpha$ -induzierte Zelltod ging einher mit einer Mitochondrienschwellung (Rutka et al. 1988), der Generierung von Wasserstoffperoxid in den Mitochondrien (Hennet et al. 1993) und der Hemmung der Atmungskette (Higuchi et al. 1992). Die in der vorliegenden Arbeit 180-fach gesteigerte Expression von $\text{TNF-}\alpha$ kann

somit auch als Erklärungsansatz für die signifikant erniedrigte Integrität der Mitochondrien angesehen werden.

Die vorliegenden Daten verdeutlichen den Forschungsbedarf bezüglich des Zusammenhangs zwischen mitochondrialer Dysfunktion und Herzinsuffizienz bei OSAS. In diesem Zusammenhang ebenfalls von Interesse sind die Ergebnisse von Picard et al., welche im Skelettmuskel eines Maus-Modells Hinweise für Membran-Interaktionen zwischen den Mitochondrien erkennen lassen. Diese sind abhängig von Ruhe- oder Aktivitätszuständen des Skelettmuskels und in Abbildung 46 exemplarisch dargestellt (Picard et al. 2013), wobei in Abbildung 47 ähnliche Korrelate in unserem Maus-Modell entdeckt werden können.

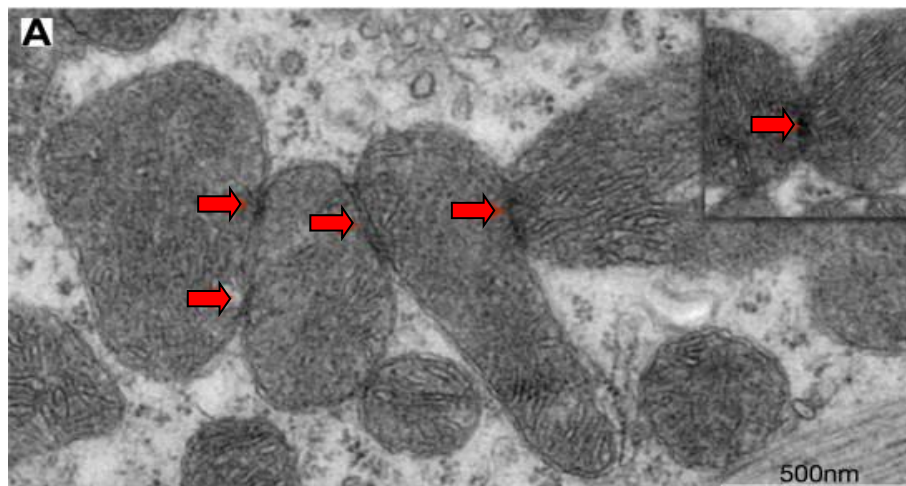


Abbildung 46: Mitochondriale Membran-Interaktionen im Skelettmuskel

Mitochondriale Membran-Interaktionen im Skelettmuskel der Maus infolge muskulärer Aktivität (Picard et al. 2013, modifiziert).

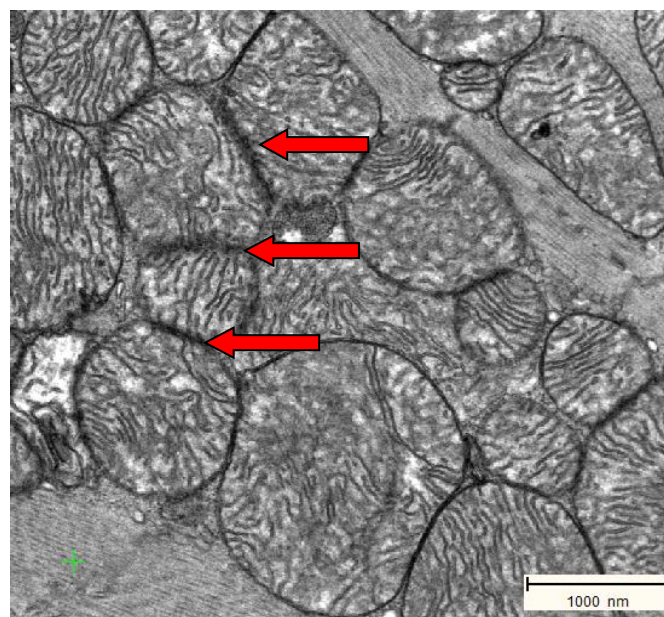


Abbildung 47: Mitochondriale Membran-Interaktionen im Myokard

Mitochondriale Membran-Interaktionen im Myokard einer KON-Maus, 16.000-fache Vergrößerung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Maus-Modell der CIH in den Untersuchungen von Frau Dr. Simone Kraut zu einem signifikanten Anstieg sowohl des systolischen als auch des diastolischen Blutdrucks führt. Außerdem kann eine signifikante Rechtsherzhypertrophie der Tiere detektiert werden, welche am ehesten der pulmonalen Hypertonie infolge eines signifikanten vaskulären Remodelings der pulmonalen Gefäße geschuldet werden kann. Der linke Ventrikel zeigt sich jedoch unauffällig; auch hinsichtlich des Kollagengehaltes können keine Unterschiede beobachtet werden (Dissertation Kraut 2014). Möglicherweise ist für dieses Ergebnis die erhöhte Expression von Notch1 verantwortlich, welches über verschiedene Mechanismen die Entwicklung von kardialen Remodeling vermindert. Die Bedeutung der PMCA4 im Rahmen der Hypertrophie-Entwicklung kann angesichts der unterschiedlichen Daten nicht eindeutig geklärt werden, wobei die isolierte Rechtsherzhypertrophie bei ansonsten unauffälligem Myokard trotz stark erhöhter Expression der PMCA4b am ehesten für einen protektiven kardialen Effekt der PMCA4b spricht.

Für die OSAS-assoziierte Entwicklung einer ventrikulären Dysfunktion spielt möglicherweise die massive Hochregulation von SOCS3 eine zentrale Rolle. Das Protein hemmt nicht nur kardioprotektive Signalwege, sondern trägt über eine Schädigung der Mitochondrien auch zu deren Dysfunktion bei.

5 Zusammenfassung

Das Syndrom der obstruktiven Schlafapnoe (OSAS) ist die häufigste schlafbezogene Atemstörung, bei der ein verminderter Muskeltonus der Rachenmuskulatur zu einem partiellen oder vollständigen Kollaps der Atemwege im Schlaf führt. In der Folge reduziert sich der Atemfluss bis hin zur Apnoe, welche mitunter eine Minute und darüber hinaus andauern kann. Der konsekutive Abfall des Sauerstoffpartialdrucks und die Ausbildung einer Hyperkapnie resultieren letztlich über eine Sympathikusaktivierung in einer Weckreaktion. Die betroffenen Patienten berichten von ausgeprägter Tagesmüdigkeit und weisen ein erhöhtes Risiko auf, Begleiterkrankungen wie arterielle Hypertonie, KHK und Herzinsuffizienz zu entwickeln. In Anbetracht der steigenden Inzidenz des Hauptrisikofaktors Adipositas erhöht sich ebenso die Prävalenz des OSAS, weshalb dem Krankheitsbild und den zugrundeliegenden Pathomechanismen verstärkt Bedeutung beigemessen wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die histomorphologische und molekularbiologische Untersuchung linksventrikulärer Myokardveränderungen, welche im Rahmen des OSAS die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und ventrikulären Dysfunktion begünstigen. Dazu diente ein Maus-Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie (CIH) (männliche C57BL/6J-Mäuse), im Rahmen dessen eine Versuchsgruppe CIH (n=10) zur Imitation eines schweren OSAS sechs Wochen lang für acht Stunden pro Tag einem minütlichen Wechsel aus Normoxie (21% O₂) und Hypoxie (6-7% O₂) ausgesetzt und mit einer normoxischen Kontrollgruppe KON (n=11) verglichen wurde. Die linksventrikulären Myokardproben wurden mittels (Immun-)Histochemie, qRT-PCR und Elektronenmikroskopie hinsichtlich Angiogenese, Inflammation, Apoptose und mitochondrialer Integrität untersucht. Dabei zeigten sich die angiogenetischen Marker VEGF-A, VEGF-B, KDR und Notch1 auf RNA-Ebene erhöht, was als Antwort auf die unzureichende Sauerstoffversorgung des Gewebes unter CIH angesehen werden kann. Diesen angiogenetischen Signalen folgt jedoch offenbar histochemisch keine nachweisbare signifikante Kapillarneubildung. Sie scheinen im vorliegenden Modell ineffektiv zu sein, was durch die CIH-assoziierte Inflammation bedingt sein kann. So zeigten sich die pro-inflammatorischen Marker TNF- α , COX-2 und IL-1 β auf molekularbiologischer und zum Teil auch auf immunhistochemischer Ebene signifikant erhöht, wobei vor allem TNF- α und IL-1 β zu einer Störung des pro-angiogenetisch wirksamen Notch1-Signalweges führen können. Notch1 wirkt über eine Hemmung von Fibrosierungs- und Hypertrophierungsprozessen außerdem kardioprotektiv,

was als Erklärung für den im vorliegenden Maus-Modell geringen myokardialen Kollagengehalt und die fehlende linksventrikuläre Hypertrophie angesehen werden kann. Es kann jedoch auch mit der PMCA4b-Hochregulation assoziiert sein, welche in der Literatur bereits mit einer Verminderung von Hypertrophie und Fibrose in Verbindung gebracht werden konnte. Auch die Expression von SOCS3 zeigte sich stark erhöht. Dieses Protein wird mit gesteigerter Inflammation, Fibrose und mitochondrialer Schädigung in Zusammenhang gebracht, wobei in der vorliegenden Arbeit mittels Elektronenmikroskopie eine Störung der mitochondrialen Integrität detektiert werden konnte. Diese vermehrten Mitochondrien-Defekte könnten zur ventrikulären Dysfunktion infolge CIH beitragen und klinisch eine Rolle bei der Herzinsuffizienz bei OSAS spielen.

6 Summary

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is the most common sleep related breathing disorder and goes along with a decreased tone of the pharyngeal muscles leading to a partial or complete collapse of the upper airway during sleep which reduces the breath flow up to apnoea. It can take a minute or longer and causes a decline of the partial pressure of oxygen and oxygen saturation as well as an increase of the partial pressure of carbon dioxide. The sleep apnea is terminated by an arousal because of activation of sympathetic nervous system. The affected patients complain about daytime fatigue and show an enhanced risk for cardiovascular diseases like arterial hypertension, coronary heart disease and congestive heart failure. Considering the increasing incidence of the main risk factor obesity, prevalence of OSAS raises as well. That is the reason why we have to focus on this disease pattern and the underlying pathomechanisms.

This dissertation's aim is the examination of histomorphological and molecular biological alterations of the leftventricular myocard promoting the development of cardial hypertrophy and ventricular dysfunction.

We used a mouse model of chronic intermittend hypoxia (CIH) (male C57BL/6J mice) and compared a normoxic control group KON (n=11) with a treatment group CIH (n=10). To imitate a severe OSAS, the treatment group has been exposed to a minute-by-minute change of normoxia (21% oxygen) and hypoxia (6-7% oxygen) eight hours a day for six weeks. To examine leftventricular tissue samples concerning angiogenesis, inflammation, apoptosis and mitochondrial integrity, we used (immuno-)histochemistry, qRT-PCR and electron microscopy. The angiogenic markers VEGF-A, VEGF-B, KDR and Notch1 appeared increased as a response to the insufficient oxygen supply of the tissue caused by CIH. The angiogenic signals were not followed by a significant capillary growth. They seem to be ineffective which might be caused by the CIH associated inflammation. The pro-inflammatory markers TNF- α , COX-2 and IL1- β showed a significant increase of RNA-levels as well as positive cells in immunohistochemistry. TNF- α and IL1- β are able to influence the pro-angiogenic Notch1 signaling pathway which appears cardioprotective via inhibition of fibrosis and hypertrophy. This may be one reason for the missing leftventricular hypertrophy. Another one can be the upregulation of PMCA4b which was associated with less hypertrophy and fibrosis in literature.

Furthermore, the RNA-level of SOCS3 was increased, too. The protein is linked to inflammation, fibrosis and mitochondrial damage. Fitting to this, we detected a disruption of the mitochondrial integrity which might contribute to the ventricular dysfunction caused by CIH and might have a clinical impact on congestive heart failure linked to OSAS.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A.	<i>Arteria</i>
A. dest.	<i>Aqua destillata</i> - destilliertes Wasser
AHI	Apnoe-Hypopnoe-Index
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell-lymphoma 2</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> - komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIH	chronisch intermittierende Hypoxie
CCH	chronisch konstante Hypoxie
COX	Cyclooxygenase
CPAP	<i>continuous positive airway pressure</i>
CRP	C-reaktives Protein

CSAS	zentrales Schlafapnoe-Syndrom
CT	Cardiotropin
DAB	Diaminobenzidin
DBA	2-Dodecenyl-Bernsteinsäureanhydrid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> -Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
Drp1	<i>dynamamin related protein</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i> - Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalographie
EKG	Elektrokardiographie
EMG	Elektromyogramm
EOG	Elektrookulographie
EPO	Erythropoeitin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET	Ejektionszeit
FiO ₂	inspiratorischer Sauerstoffanteil/Sauerstofffraktion der Atemluft
Fis1	<i>mitochondrial fission</i>
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GLUT	Glukose-Transporter
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

Hb	Hämoglobin
HbA _{1c}	Hämoglobin A _{1c}
HCL	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF	Hypoxie induzierter Faktor
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IVCT	isovolumetrische Kontraktionszeit
IVRT	isovolumetrische Relaxationszeit
JAK	Januskinase
KCL	Kaliumchlorid
KDR	<i>Kinase insert domaine receptor</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
KON	Kontrollgruppe Normoxie
L	Liter
LIF	Leukämiehemmender Faktor
M	Molar
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mfn1	Mitofusin 1
Mfn2	Mitofusin 2
ml	Milliliter
mM	Millimolar

mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MNA	1-Methyl-5-norbornen-2,3-dicarbonsäureanhydrid
MPI	<i>Myocardial Performance Index</i>
MPT	<i>Mitochondrial Permeability Transition</i>
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NF-AT3	<i>nuclear factors of activated T-cells 3</i>
NF-kB	Nukleärer Faktor-kappa B
NHE1	<i>Sodium/proton-exchanger</i>
nm	Nanometer
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NSS	Normales Schweineserum
OSAS	Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom
p _a O ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PAS	<i>Periodic acid-Schiff reaction</i> - Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i> - phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
PFA	Paraformaldehyd
PMCA	Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase
POD	Peroxidase

Q	quantitativ
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction</i> - Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIN	<i>RNA Integrity number</i> - RNA-Integritätsnummer
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
RT	Reverse Transkriptase
sek	Sekunde
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> - Standardfehler des Mittelwertes
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
SpO ₂	Sauerstoffsättigung
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TAC	<i>transverse aortic constriction</i>
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPPP	Uvulopalatopharyngoplastik
VDAC	<i>Voltage dependent Anion Channel</i>
VES	ventrikuläre Extrasystolen
VHF	Vorhofflimmern
WHO	<i>World Health Organization</i>

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht schlafbezogener Atmungsstörungen	2
Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte	32
Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien.....	34
Tabelle 4: Liste der verwendeten Materialien.....	35
Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper	36
Tabelle 6: Liste der verwendeten Primer.....	38
Tabelle 7: Liste der verwendeten Kits	38
Tabelle 8: Liste der Anwendungen.....	39

9 Bildverzeichnis

Abbildung 1: Diagnosekriterien des OSAS	3
Abbildung 2: Partielle und vollständige Obstruktion der oberen Atemwege bei OSAS	5
Abbildung 3: Übersicht der Risikofaktoren des OSAS	8
Abbildung 4: OSAS als kardiovaskulärer Risikofaktor	10
Abbildung 5: Die Bedeutung von Notch für kardiales Remodeling	20
Abbildung 6: SOCS3-Knockout bei Myokardinfarkt	26
Abbildung 7: Versuchskammer und CIH	41
Abbildung 8: Beispiele für Mitochondrien mit vollständig intakter äußerer Doppelmembran und vollständig intakten Cristae	53
Abbildung 9: Beispiele für Mitochondrien, deren Cristae zu >50% erhalten sind und deren äußere Doppelmembran vollständig intakt ist	53
Abbildung 10: Beispiele für Mitochondrien, deren Cristae vollständig intakt sind und deren äußere Doppelmembran zu >50% erhalten ist	53
Abbildung 11: Beispiele für Mitochondrien, deren Cristae und äußere Doppelmembran zu >50% erhalten sind	54
Abbildung 12: Beispiele für Mitochondrien, deren äußere Doppelmembran zwar erhalten, aber deren Cristae vollständig zerstört sind	54
Abbildung 13: Beispiele für Mitochondrien, deren Cristae zwar erhalten sind, aber deren äußere Doppelmembran vollständig zerstört ist	54
Abbildung 14: Beispiele für Mitochondrien, deren Cristae und äußere Doppelmembran zu >50% zerstört sind	55
Abbildung 15: Beispiele für Mitochondrien, deren Cristae und äußere Doppelmembran vollständig zerstört sind	55
Abbildung 16: Anzahl der Kapillaren pro mm ² linksventrikulärem Myokard.....	56
Abbildung 17: Lectin-Färbung, KON	57
Abbildung 18: Lectin-Färbung, CIH.....	57
Abbildung 19: Ergebnisse der Untersuchung der angiogenetischen Marker	58
Abbildung 20: Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung von COX-2.....	59
Abbildung 21: Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung von COX-2.....	60
Abbildung 22: COX-2 Immunhistochemie, KON.....	60
Abbildung 23: COX-2 Immunhistochemie, CIH	60
Abbildung 24: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von TNF-α	61

Abbildung 25: Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung von TNF- α	62
Abbildung 26: TNF- α Immunhistochemie, KON	62
Abbildung 27: TNF- α Immunhistochemie, CIH	62
Abbildung 28: Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung von IL-1 β	63
Abbildung 29: Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung von IL-1 β	64
Abbildung 30: IL-1 β Immunhistochemie, KON	64
Abbildung 31: IL-1 β Immunhistochemie, CIH	64
Abbildung 32: Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung von IL-6	65
Abbildung 33: Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung der PMCA4va	66
Abbildung 34: Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung der PMCA4b	66
Abbildung 35: Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung von SOCS3	67
Abbildung 36: Ergebnisse der Untersuchung der Apoptose-Marker	68
Abbildung 37: Anzahl der Mitochondrien pro 40 μm^2 linksventrikulärem Myokard	69
Abbildung 38: Elektronenmikroskopische Aufnahme, KON	70
Abbildung 39: Elektronenmikroskopische Aufnahme, CIH	70
Abbildung 40: Anteil der Mitochondrienfläche an der Gesamtfläche in Prozent	71
Abbildung 41: Durchschnittliche Mitochondriengröße in μm^2	72
Abbildung 42: Integrität der Mitochondrien	73
Abbildung 43: Schematische Darstellung der Pathomechanismen des linksventrikulären Remodelings	83
Abbildung 44: Schematische Darstellung der Interaktionen der PMCA	89
Abbildung 45: Beispiele für beschädigte Mitochondrien	94
Abbildung 46: Mitochondriale Membran-Interaktionen im Skelettmuskel	96
Abbildung 47: Mitochondriale Membran-Interaktionen im Myokard	97

10 Literaturverzeichnis

Afroze, Talat; Yang, Ge; Khoshbin, Amir; Tanwir, Mansoor; Tabish, Taha; Momen, Abdul; Husain, Mansoor (2014): Calcium efflux activity of plasma membrane Ca^{2+} ATPase-4 (PMCA4) mediates cell cycle progression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 289 (10), S. 7221–7231.

Akashiba, T.; Minemura, H.; Yamamoto, H.; Kosaka, N.; Saito, O.; Horie, T. (1999): Nasal continuous positive airway pressure changes blood pressure "non-dippers" to "dippers" in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep* 22 (7), S. 849–853.

Akinnusi, Morohunfolu E.; Paasch, Linda L.; Szarpa, Kristie R.; Wallace, Paul K.; El Solh, Ali A (2009): Impact of nasal continuous positive airway pressure therapy on markers of platelet activation in patients with obstructive sleep apnea. *Respiration* 77 (1), S. 25–31.

Al-Dossary, Amal A.; Strehler, Emanuel E.; Martin-Deleon, Patricia A. (2013): Expression and secretion of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm. *PLoS One* 8 (11), S. e80181.

Alonso-Fernandez, A.; Garcia-Rio, F.; Arias, M. A.; Hernanz, A.; de la Pena, M; Pierola, J. et al. (2009): Effects of CPAP on oxidative stress and nitrate efficiency in sleep apnoea: a randomised trial. *Thorax* 64 (7), S. 581–586.

Altekin, Refik Emre; Karakas, Mustafa Serkan; Yanikoglu, Atakan; Ozel, Deniz; Ozbudak, Omer; Demir, Ibrahim; Deger, Necmi (2012): Determination of right ventricular dysfunction using the speckle tracking echocardiography method in patients with obstructive sleep apnea. *Cardiol J* 19 (2), S. 130–139.

Alvarez, Bernardo V.; Villa-Abrille, Maria C. (2013): Mitochondrial NHE1: a newly identified target to prevent heart disease. *Frontiers in Physiology* Vol. 4 (152), S. 1-8

American Academy of Sleep Medicine (2014): International Classification of Sleep Disorders – Third Edition (ICSD-3) Online Version. Online verfügbar unter <http://www.aasmnet.org/store/product.aspx?pid=849>, zuletzt geprüft am 03.02.2015.

Arias, Miguel A.; Garcia-Rio, Francisco; Alonso-Fernandez, Alberto; Mediano, Olga; Martinez, Isabel; Villamor, Jose (2005): Obstructive sleep apnea syndrome affects left ventricular diastolic function: effects of nasal continuous positive airway pressure in men. *Circulation* 112 (3), S. 375–383.

- Ashley, Euan A.; Sears, Claire E.; Bryant, Simon M.; Watkins, Hugh C.; Casadei, Barbara (2002): Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and beta-adrenergic contractility in murine ventricular myocytes. *Circulation* 105 (25), S. 3011–3016.
- Aslan, Kezban; Deniz, Ali; Cayli, Murat; Bozdemir, Hacer; Sarica, Yakup; Seydaoglu, Gulsah (2013): Early left ventricular functional alterations in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Cardiol J* 20 (5), S. 519–525.
- AWMF-S2-Leitlinie (2009): Therapie der obstruktiven Schlafapnoe des Erwachsenen.
- Babu, Ambika R.; Herdegen, James; Fogelfeld, Leon; Shott, Susan; Mazzone, Theodore (2005): Type 2 diabetes, glycemic control, and continuous positive airway pressure in obstructive sleep apnea. *Arch Intern Med* 165 (4), S. 447–452.
- Baggott, Rhiannon R.; Alfranca, Arantzazu; López-Maderuelo, Dolores; Mohamed, Tamer M. A.; Escolano, Amelia; Oller, Jorge et al. (2014): Plasma membrane calcium ATPase isoform 4 inhibits vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis through interaction with calcineurin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34 (10), S. 2310–2320.
- Baguet, Jean-Philippe; Barone-Rochette, Gilles; Tamisier, Renaud; Levy, Patrick; Pépin, Jean-Louis (2012a): Mechanisms of cardiac dysfunction in obstructive sleep apnea. *Nat Rev Cardiol* 9 (12), S. 679–688.
- Baguet, Jean-Philippe; Barone-Rochette, Gilles; Tamisier, Renaud; Levy, Patrick; Pépin, Jean-Louis (2012b): Mechanisms of cardiac dysfunction in obstructive sleep apnea. *Nat Rev Cardiol* 9 (12), S. 679–688.
- Baguet, Jean-Philippe; Hammer, Laure; Levy, Patrick; Pierre, Helene; Rossini, Eliane; Mouret, Sandrine et al. (2005): Night-time and diastolic hypertension are common and underestimated conditions in newly diagnosed apnoeic patients. *J Hypertens* 23 (3), S. 521–527.
- Baguet, J-P; Barone-Rochette, G.; Lévy, P.; Vautrin, E.; Pierre, H.; Ormezzano, O.; Pépin, J-L (2010): Left ventricular diastolic dysfunction is linked to severity of obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 36 (6), S. 1323–1329.
- Bai, Li; Yu, Zubin; Qian, Guisheng; Qian, Pin; Jiang, Jinjun; Wang, Guansong; Bai, Chunxue (2006): SOCS3 was induced by hypoxia and suppressed STAT3 phosphorylation in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Respir Physiol Neurobiol* 152 (1), S. 83–91.

- Ballester, E.; Badia, J. R.; Hernandez, L.; Carrasco, E.; Pablo, J. de; Fornas, C. et al. (1999): Evidence of the effectiveness of continuous positive airway pressure in the treatment of sleep apnea/hypopnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 159 (2), S. 495–501.
- Banno, K.; Walld, R.; Kryger, M. H. (2005): Increasing obesity trends in patients with sleep-disordered breathing referred to a sleep disorders center. *Journal of Clinical Sleep Medicine* (1(4)), S. 364–366.
- Banno, Katsuhisa; Kryger, Meir H. (2007): Sleep apnea: clinical investigations in humans. In: *Sleep Med* 8 (4), S. 400–426.
- Bardos, Julia I.; Ashcroft, Margaret (2005): Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim Biophys Acta* 1755 (2), S. 107–120.
- Barouch, Lili A.; Harrison, Robert W.; Skaf, Michel W.; Rosas, Gisele O.; Cappola, Thomas P.; Kobeissi, Zoulficar A. et al. (2002): Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 416 (6878), S. 337–339.
- Bauersachs, Johann; Ertl, Georg (2006): Kardiovaskuläres Remodeling. Detlev Ganten, Klaus Ruckpaul und Josef Köhrle (Hg.): Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag (Molekulare Medizin), S. 335–352.
- Beaudin, Andrew E.; Pun, Matiram; Yang, Christina; Nicholl, David D M; Steinback, Craig D.; Slater, Donna M. et al. (2014): Cyclooxygenases 1 and 2 differentially regulate blood pressure and cerebrovascular responses to acute and chronic intermittent hypoxia: implications for sleep apnea. *J Am Heart Assoc* 3 (3), S. e000875.
- Bendall, Jennifer K.; Damy, Thibaud; Ratajczak, Philippe; Loyer, Xavier; Monceau, Virginie; Marty, Isabelle et al. (2004): Role of myocardial neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide in beta-adrenergic hyporesponsiveness after myocardial infarction-induced heart failure in rat. *Circulation* 110 (16), S. 2368–2375.
- Benedito, Rui; Rocha, Susana F.; Woeste, Marina; Zamykal, Martin; Radtke, Freddy; Casanovas, Oriol et al. (2012): Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling. *Nature* 484 (7392), S. 110–114.
- Bereiter-Hahn, J. (1990): Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol* 122, S. 1–63.

- Berthon-Jones, M.; Sullivan, C. E. (1984): Ventilation and arousal responses to hypercapnia in normal sleeping humans. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 57 (1), S. 59–67.
- Bixler, E. O.; Vgontzas, A. N.; Lin, H. M.; Have, T. ten; Rein, J.; Vela-Bueno, A.; Kales, A. (2001): Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. *Am J Respir Crit Care Med* 163 (3 Pt 1), S. 608–613.
- Bonetti, Piero O.; Lerman, Lilach O.; Lerman, Amir (2003): Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (2), S. 168–175.
- Bossy-Wetzel E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R und Lipton SA (2003) Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol.* 15, 706-716.
- Botros, Nader; Concato, John; Mohsenin, Vahid; Selim, Bernardo; Doctor, Kervin; Yaggi, Henry Klar (2009): Obstructive sleep apnea as a risk factor for type 2 diabetes. *Am J Med* 122 (12), S. 1122–1127.
- Bravo, Mde L.; Serpero, L. D.; Barceló, A.; Barbé, F.; Gozal, D. (2007): Inflammatory proteins in patients with obstructive sleep apnea with and without daytime sleepiness. *Sleep and Breathing* (11), S. 177–185.
- Cahan, C.; Decker, M. J.; Arnold, J. L.; Goldwasser, E.; Strohl, K. P. (1995): Erythropoietin levels with treatment of obstructive sleep apnea. *J Appl Physiol* (1985) 79 (4), S. 1278–1285.
- Cai, Wei-Xia; Liang, Liang; Wang, Li; Han, Jun-Tao; Zhu, Xiong-Xiang; Han, Hua et al. (2014): Inhibition of Notch signaling leads to increased intracellular ROS by up-regulating Nox4 expression in primary HUVECs. *Cell. Immunol.* 287 (2), S. 129–135.
- Calhoun, David A.; Jones, Daniel; Textor, Stephen; Goff, David C.; Murphy, Timothy P.; Toto, Robert D. et al. (2008): Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation* 117 (25), S. e510-26.
- Campen, M. J.; Shimoda, L. A.; O'Donnell, C. P. (2005): Acute and chronic cardiovascular effects of intermittent hypoxia in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol* (1985) 99 (5), S. 2028–2035.

Canessa, Nicola; Castronovo, Vincenza; Cappa, Stefano F.; Aloia, Mark S.; Marelli, Sara; Falini, Andrea et al. (2011): Obstructive sleep apnea: brain structural changes and neurocognitive function before and after treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 183 (10), S. 1419–1426.

Capodanno, Davide; Milazzo, Giovanni; Cumbo, Miriam; Marchese, Anna; Salemi, Antonella; Quartarone, Laura et al. (2014): Positive airway pressure in patients with coronary artery disease and obstructive sleep apnea syndrome. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 15 (5), S. 402–406.

Carafoli, E. (1994): Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J* 8 (13), S. 993–1002.

Carow, Berit; Rottenberg, Martin E. (2014): SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. *Frontiers in immunology* 5, S. 58.

Cartwright, R. D.; Lloyd, S.; Lilie, J.; Kravitz, H. (1985): Sleep position training as treatment for sleep apnea syndrome: a preliminary study. *Sleep* 8 (2), S. 87–94.

Chami, Hassan A.; Devereux, Richard B.; Gottdiener, John S.; Mehra, Reena; Roman, Mary J.; Benjamin, Emelia J.; Gottlieb, Daniel J. (2008a): Left ventricular morphology and systolic function in sleep-disordered breathing: the Sleep Heart Health Study. *Circulation* 117 (20), S. 2599–2607.

Chami, Hassan A.; Devereux, Richard B.; Gottdiener, John S.; Mehra, Reena; Roman, Mary J.; Benjamin, Emelia J.; Gottlieb, Daniel J. (2008b): Left ventricular morphology and systolic function in sleep-disordered breathing: the Sleep Heart Health Study. *Circulation* 117 (20), S. 2599–2607.

Chao, D. T.; Korsmeyer, S. J. (1998): BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16, S. 395–419.

Chayen, J. (1993): The mitochondrion in health and disease. D. Tyler VCH Publishers. Weinheim, New York. xv + 557 pages, 225 DM (£84) (1992). *Cell Biochem. Funct.* 11 (4), S. 291.

Ciftci, Tansu Ulukavak; Kokturk, Oguz; Bukan, Neslihan; Bilgihan, Ayse (2004): The relationship between serum cytokine levels with obesity and obstructive sleep apnea syndrome. *Cytokine* 28 (2), S. 87–91.

Cistulli, P. A. (1996): Craniofacial abnormalities in obstructive sleep apnoea: implications for treatment. *Respirology* 1 (3), S. 167–174.

Cistulli, P. A.; Grunstein, R. R.; Sullivan, C. E. (1994): Effect of testosterone administration on upper airway collapsibility during sleep. *Am J Respir Crit Care Med* 149 (2 Pt 1), S. 530–532.

Cloward, Tom V.; Walker, James M.; Farney, Robert J.; Anderson, Jeffrey L. (2003): Left ventricular hypertrophy is a common echocardiographic abnormality in severe obstructive sleep apnea and reverses with nasal continuous positive airway pressure. *Chest* 124 (2), S. 594–601.

Colish, Jane; Walker, Jonathan R.; Elmayergi, Nader; Almutairi, Saleh; Alharbi, Fawaz; Lytwyn, Matthew et al. (2012): Obstructive sleep apnea: effects of continuous positive airway pressure on cardiac remodeling as assessed by cardiac biomarkers, echocardiography, and cardiac MRI. *Chest* 141 (3), S. 674–681.

Crompton, M. (1999): The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341 (Pt 2), S. 233–249.

Croquelois, Adrien; Domenighetti, Andrea A.; Nemir, Mohamed; Lepore, Mario; Rosenblatt-Velin, Nathalie; Radtke, Freddy; Pedrazzini, Thierry (2008): Control of the adaptive response of the heart to stress via the Notch1 receptor pathway. *J Exp Med* 205 (13), S. 3173–3185.

Cross, Matthew E.; Plunkett, Emma V.E. (2014): Physics, Pharmacology and Physiology for Anaesthetists: Key Concepts for the FRCA, S. 226

Cummins, E. P.; Taylor, C. T. (2005a): Hypoxia-responsive transcription factors. *European journal of physiology* (450), S. 363–371.

Cummins, Eoin P.; Taylor, Cormac T. (2005b): Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch* 450 (6), S. 363–371.

Dai, Chun-Qiu; Luo, Ting-Ting; Luo, Shi-Cheng; Wang, Jia-Qi; Wang, Sheng-Ming; Bai, Yun-Hu; Yang, Yan-Ling; Wang, Ya-Yun (2016): p53 and mitochondrial dysfunction: novel insight of neurodegenerative diseases. *J Bioenerg Biomembr* (2016) 48 S. 337–347.

Dai, Dao-Fu; Johnson, Simon C.; Villarin, Jason J.; Chin, Michael T.; Nieves-Cintrón, Madeline; Chen, Tony et al. (2011): Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure. *Circ Res* 108 (7), S. 837–846.

Damy, Thibaud; Paulino, Alexandra; Margarit, Laurent; Drouot, Xavier; Stoica, Maria; Vermes, Emmanuelle et al. (2011): Left ventricle remodelling is associated with sleep-

disordered breathing in non-ischaemic cardiopathy with systolic dysfunction. *J Sleep Res* 20 (1 Pt 1), S. 101–109.

Damy, Thibaud; Ratajczak, Philippe; Shah, Ajay M.; Camors, Emmanuel; Marty, Isabelle; Hasenfuss, Gerd et al. (2004): Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet* 363 (9418), S. 1365–1367.

Dancey, D. R.; Hanly, P. J.; Soong, C.; Lee, B.; Hoffstein, V. (2001): Impact of menopause on the prevalence and severity of sleep apnea. *Chest* 120 (1), S. 151–155.

Davies, R. J.; Ali, N. J.; Stradling, J. R. (1992): Neck circumference and other clinical features in the diagnosis of the obstructive sleep apnoea syndrome. *Thorax* 47 (2), S. 101–105.

De Backer, W A (1995): Central sleep apnoea, pathogenesis and treatment: an overview and perspective. *Eur Respir J* 8 (8), S. 1372–1383.

de la Pompa, Jose Luis; Epstein, Jonathan A. (2012): Coordinating tissue interactions: Notch signaling in cardiac development and disease. *Dev Cell* 22 (2), S. 244–254.

Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquelléc L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J und Hamel CP (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat.Genet.* 26, 207-210.

Dempsey, Jerome A.; Smith, Curtis A.; Przybylowski, Tadeuez; Chenuel, Bruno; Xie, Ailiang; Nakayama, Hideaki; Skatrud, James B. (2004): The ventilatory responsiveness to CO₂ below eupnoea as a determinant of ventilatory stability in sleep. *The Journal of Physiology* 560 (Pt 1), S. 1–11.

Dery, Marc-Andre C.; Michaud, Maude D.; Richard, Darren E. (2005): Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol* 37 (3), S. 535–540.

Desagher, S.; Martinou, J. C. (2000): Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10 (9), S. 369–377.

Dimsdale, J. E.; Coy, T.; Ziegler, M. G.; Ancoli-Israel, S.; Clausen, J. (1995): The effect of sleep apnea on plasma and urinary catecholamines. *Sleep* 18 (5), S. 377–381.

Duchna, H-W (2006): Schlafbezogene Atmungsstörungen--Neuaufgabe der Internationalen Klassifikation von Schlafstörungen (ICSD-2) der American Academy of Sleep Medicine (AASM). *Pneumologie* 60 (9), S. 568–575.

Dursunoglu, D.; Dursunoglu, N.; Evrengul, H.; Ozkurt, S.; Kuru, O.; Kilic, M.; Fisekci, F. (2005): Impact of obstructive sleep apnoea on left ventricular mass and global function. *Eur Respir J* 26 (2), S. 283–288.

Eirin, Alfonso; Lerman, Amir; Lerman, Lilach O. (2014): Mitochondrial injury and dysfunction in hypertension-induced cardiac damage. *Eur. Heart J.* 35 (46), S. 3258–3266.

Eldridge, Frederic L.; Millhorn, David E. (2011): Oscillation, Gating, and Memory in the Respiratory Control System. Ronald Terjung (Hg.): *Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Faccenda, J. F.; Mackay, T. W.; Boon, N. A.; Douglas, N. J. (2001): Randomized placebo-controlled trial of continuous positive airway pressure on blood pressure in the sleep apnea-hypopnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 163 (2), S. 344–348.

Fagan, K. A. (2001): Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 90 (6), S. 2502–2507.

Fagan, K. A.; Morrissey, B.; Fouty, B. W.; Sato, K.; Harral, J. W.; Morris, K G Jr et al. (2001): Upregulation of nitric oxide synthase in mice with severe hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Respir Res* 2 (5), S. 306–313.

Fan, Chenhao; Iacobas, Dumitru A.; Zhou, Dan; Chen, Qiaofang; Lai, James K.; Gavrilov, Orit; Haddad, Gabriel G. (2005): Gene expression and phenotypic characterization of mouse heart after chronic constant or intermittent hypoxia. *Physiol Genomics* 22 (3), S. 292–307.

Fandrey, Joachim; Gorr, Thomas A.; Gassmann, Max (2006): Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc Res* 71 (4), S. 642–651.

Fantinelli, J. C., Cingolani, H. E., and Mosca, S. M. (2006). Na⁺/H⁺ exchanger inhibition at the onset of reperfusion decreases myocardial infarct size: role of reactive oxygen species. *Cardiovasc. Pathol.* 15, 179–184.

Fields J, Hanisch JJ, Choi JW, Hwang PM (2007) How does p53 regulate mitochondrial respiration? *IUBMB life* 59:682–684

- Fletcher, E. C. (1995): The relationship between systemic hypertension and obstructive sleep apnea: facts and theory. *Am J Med* 98 (2), S. 118–128.
- Follenius, M.; Krieger, J.; Krauth, M. O.; Sforza, F.; Brandenberger, G. (1991): Obstructive sleep apnea treatment: peripheral and central effects on plasma renin activity and aldosterone. *Sleep* 14 (3), S. 211–217.
- Frangogiannis, Nikolaos G. (2014): The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol* 11 (5), S. 255–265.
- Fritz S, Rapaport D, Klanner E, Neupert W und Westermann B (2001) Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J.Cell Biol.* 152, 683-692.
- Fukuda, Daiju; Aikawa, Elena; Swirski, Filip K.; Novobrantseva, Tatiana I.; Kotelianski, Victor; Gorgun, Cem Z. et al. (2012): Notch ligand delta-like 4 blockade attenuates atherosclerosis and metabolic disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (27), S. E1868-77.
- Fung, Erik; Tang, Sai-Man Timothy; Canner, James P.; Morishige, Kunio; Arboleda-Velasquez, Joseph F.; Cardoso, Angelo A. et al. (2007): Delta-like 4 induces notch signaling in macrophages: implications for inflammation. *Circulation* 115 (23), S. 2948–2956.
- Gajarsa, Jason J.; Kloner, Robert A. (2011): Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. *Heart Fail Rev* 16 (1), S. 13–21.
- Gami, Apoor S.; Howard, Daniel E.; Olson, Eric J.; Somers, Virend K. (2005): Day-night pattern of sudden death in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 352 (12), S. 1206–1214.
- Gami, Apoor S.; Pressman, Gregg; Caples, Sean M.; Kanagala, Ravi; Gard, Joseph J.; Davison, Diane E. et al. (2004): Association of atrial fibrillation and obstructive sleep apnea. *Circulation* 110 (4), S. 364–367.
- Gao, Jing; Hua, Qi; Li, Jing; Wang, Cai-Rong (2009): The incremental effect of obstructive sleep apnea syndrome on right and left ventricular myocardial performance in newly diagnosed essential hypertensive subjects. *Hypertens Res* 32 (3), S. 176–181.

- Giles, T. L.; Lasserson, T. J.; Smith, B. H.; White, J.; Wright, J.; Cates, C. J. (2006): Continuous positive airways pressure for obstructive sleep apnoea in adults. *Cochrane Database Syst Rev* (3), S. CD001106.
- Glass, C. K.; Witztum, J. L. (2001): Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104 (4), S. 503–516.
- Goodhew, Peter J.; Clewing, Ulrike; Humphreys, F. J. (1991): Elektronenmikroskopie: Grundlagen und Anwendung. London [u.a.]: McGraw-Hill.
- Gottlieb, Daniel J.; Yenokyan, Gayane; Newman, Anne B.; O'Connor, George T.; Punjabi, Naresh M.; Quan, Stuart F. et al. (2010): Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study. *Circulation* 122 (4), S. 352–360.
- Green, D. R.; Reed, J. C. (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science* 281 (5381), S. 1309–1312.
- Gross, A.; Jockel, J.; Wei, M. C.; Korsmeyer, S. J. (1998): Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 17 (14), S. 3878–3885.
- Grote, L.; Hedner, J.; Peter, J. H. (2000): Sleep-related breathing disorder is an independent risk factor for uncontrolled hypertension. *J Hypertens* 18 (6), S. 679–685.
- Gu, Qiang; Kong, Yan; Yu, Zu-Bin; Bai, Li; Xiao, Ying-Bin (2011): Hypoxia-induced SOCS3 is limiting STAT3 phosphorylation and NF-kappaB activation in congenital heart disease. *Biochimie* 93 (5), S. 909–920.
- Gude, Natalie A.; Emmanuel, Gregory; Wu, Weitao; Cottage, Christopher T.; Fischer, Kimberlee; Quijada, Pearl et al. (2008): Activation of Notch-mediated protective signaling in the myocardium. *Circ Res* 102 (9), S. 1025–1035.
- Guilleminault, C.; Connolly, S. J.; Winkle, R. A. (1983): Cardiac arrhythmia and conduction disturbances during sleep in 400 patients with sleep apnea syndrome. *Am J Cardiol* 52 (5), S. 490–494.
- Guilleminault, C.; Tilkian, A.; Dement, W. C. (1976): The sleep apnea syndromes. *Annu Rev Med* 27, S. 465–484.
- Haggerty, Juliana M.; Wang, Xiao N.; Dickinson, Anne; O'Malley, Chris J.; Martin, Elaine B. (2014): Segmentation of epidermal tissue with histopathological damage in images of

haematoxylin and eosin stained human skin. BMC Medical Imaging. Online verfügbar unter <http://www.biomedcentral.com/1471-2342/14/7>, zuletzt geprüft am 15.12.2014.

Haider, Agha W.; Larson, Martin G.; Franklin, Stanley S.; Levy, Daniel (2003): Systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and pulse pressure as predictors of risk for congestive heart failure in the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 138 (1), S. 10–16.

Hales KG und Fuller MT (1997) Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 90, 121-129.

Halestrap, Andrew P. (2010): A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans* 38 (4), S. 841–860.

Han, Qian; Yeung, Sze C.; Ip, Mary S M; Mak, Judith C W (2014): Cellular mechanisms in intermittent hypoxia-induced cardiac damage in vivo. *J Physiol Biochem* 70 (1), S. 201–213.

Hare, Joshua M.; Stamler, Jonathan S. (2005): NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest* 115 (3), S. 509–517.

Haruki, Nobuhiko; Takeuchi, Masaaki; Nakai, Hiromi; Kanazawa, Yoshio; Tsubota, Noriko; Shintome, Rie et al. (2009): Overnight sleeping induced daily repetitive left ventricular systolic and diastolic dysfunction in obstructive sleep apnoea: quantitative assessment using tissue Doppler imaging. *Eur J Echocardiogr* 10 (6), S. 769–775.

Hayashi, Tetsuya; Yamashita, Chika; Matsumoto, Chika; Kwak, Chol-Jun; Fujii, Kiwako; Hirata, Tomoko et al. (2008): Role of gp91phox-containing NADPH oxidase in left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxic stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294 (5), S. H2197-203.

Hedner, J.; Ejnell, H.; Caidahl, K. (1990): Left ventricular hypertrophy independent of hypertension in patients with obstructive sleep apnoea. *J Hypertens* 8 (10), S. 941–946.

Herold, Gerd (2015.): Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. 2015. Aufl. Köln: Herold.

Herskowitz, A.; Choi, S.; Ansari, A. A.; Wesselingh, S. (1995): Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *The American Journal of Pathology* 146 (2), S. 419–428.

- Higuchi M, Shirotani K, Higashi N, Toyoshima S and Osawa T. (1992). J. Immunother., 12, 41 ± 49.
- Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 1993.
- Higuchi, Masahiro; Proske, Rita J.; Yeh, Edward T.H. (1998): Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene* 17, S. 2515-2524.
- Holton, Mary Louisa; Wang, Weiguang; Emerson, Michael; Neyses, Ludwig; Armesilla, Angel L. (2010): Plasma membrane calcium ATPase proteins as novel regulators of signal transduction pathways. *World journal of biological chemistry* 1 (6), S. 201–208.
- Holton, Marylouisa; Di Yang; Wang, Weiguang; Mohamed, Tamer M. A.; Neyses, Ludwig; Armesilla, Angel L. (2007): The interaction between endogenous calcineurin and the plasma membrane calcium-dependent ATPase is isoform specific in breast cancer cells. *FEBS Lett.* 581 (21), S. 4115–4119.
- Honda, S., Aihara, T., Hontani, M., Okubo, K. und Hirose, S. (2005). Mutational analysis of action of mitochondrial fusion factor mitofusin-2. *J. Cell Sci.* 118, 3153-3161.
- Huang, Hong; Huang, Feng; Huang, Jian-Ping (2013): Transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells overexpressing Delta-like-4 enhances functional neovascularization in ischemic myocardium. *Mol Med Report* 8 (5), S. 1556–1562.
- HUGO Gene Nomenclature Committee (2008): VEGFA vascular endothelial growth factor A [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7422>, zuletzt geprüft am 04.03.2015.
- Imagawa, S.; Yamaguchi, Y.; Higuchi, M.; Neichi, T.; Hasegawa, Y.; Mukai, H. Y. et al. (2001a): Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea--hypopnea syndrome. *Blood* 98 (4), S. 1255–1257.
- Imagawa, S.; Yamaguchi, Y.; Higuchi, M.; Neichi, T.; Hasegawa, Y.; Mukai, H. Y. et al. (2001b): Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea--hypopnea syndrome. *Blood* 98 (4), S. 1255–1257.
- Imagawa, S.; Yamaguchi, Y.; Ogawa, K.; Obara, N.; Suzuki, N.; Yamamoto, M.; Nagasawa, T. (2004): Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Respiration* 71 (1), S. 24–29.

- Ip, Mary S M; Lam, Bing; Ng, Matthew M T; Lam, Wah Kit; Tsang, Kenneth W T; Lam, Karen S L (2002): Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance. *Am J Respir Crit Care Med* 165 (5), S. 670–676.
- Ishikawa, Shizukiyo; Kario, Kazuomi; Kayaba, Kazunori; Gotoh, Tadao; Nago, Naoki; Nakamura, Yosikazu et al. (2007): Linear Relationship Between Blood Pressure and Stroke: The Jichi Medical School Cohort Study. *The Journal of Clinical Hypertension* 9 (9), S. 677–683.
- Ito, H.; Adachi, S.; Tamamori, M.; Fujisaki, H.; Tanaka, M.; Lin, M. et al. (1996): Mild hypoxia induces hypertrophy of cultured neonatal rat cardiomyocytes: a possible endogenous endothelin-1-mediated mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 28 (6), S. 1271–1277.
- Jakobs, Stefan (2004): Mitochondrien - Dynamische Kraftwerke der Zelle. Göttingen: Max-Planck Institut für biophysikalische Chemie; MPIbpc News 10 (2004), Heft 12, S. 1–4.
- Jakobsson, Lars; Bentley, Katie; Gerhardt, Holger (2009): VEGFRs and Notch: a dynamic collaboration in vascular patterning. *Biochem Soc Trans* 37 (Pt 6), S. 1233–1236.
- Javaheri, S.; Parker, T. J.; Liming, J. D.; Corbett, W. S.; Nishiyama, H.; Wexler, L.; Roselle, G. A. (1998): Sleep Apnea in 81 Ambulatory Male Patients With Stable Heart Failure. Types and Their Prevalences, Consequences, and Presentations. *Circulation* 97 (21), S. 2154–2159.
- Jelkmann, W. (1992): Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 72 (2), S. 449–489.
- Jenkinson, C.; Davies, R. J.; Mullins, R.; Stradling, J. R. (1999): Comparison of therapeutic and subtherapeutic nasal continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnoea: a randomised prospective parallel trial. *Lancet* 353 (9170), S. 2100–2105.
- Jun, Jonathan; Polotsky, Vsevolod Y. (2009): Metabolic consequences of sleep-disordered breathing. *ILAR J* 50 (3), S. 289–306.
- Kanagala, Ravi; Murali, Narayana S.; Friedman, Paul A.; Ammash, Naser M.; Gersh, Bernard J.; Ballman, Karla V. et al. (2003): Obstructive sleep apnea and the recurrence of atrial fibrillation. *Circulation* 107 (20), S. 2589–2594.
- Kanel, Roland von; Lored, Jose S.; Powell, Frank L.; Adler, Karen A.; Dimsdale, Joel E. (2005): Short-term isocapnic hypoxia and coagulation activation in patients with sleep apnea. *Clin Hemorheol Microcirc* 33 (4), S. 369–377.

Kapur, V. K.; Baldwin, C. M.; Resnick, H. E.; Gottlieb, D. J.; Nieto, F. J. (2005): Sleepiness in patients with moderate to severe sleep-disordered breathing. *Sleep* (28), S. 472–477.

Kario, Kazuomi (2009): Obstructive sleep apnea syndrome and hypertension: ambulatory blood pressure. *Hypertens Res* 32 (6), S. 428–432.

Kario, Kazuomi; Ishikawa, Joji; Pickering, Thomas G.; Hoshida, Satoshi; Eguchi, Kazuo; Morinari, Masato et al. (2006): Morning hypertension: the strongest independent risk factor for stroke in elderly hypertensive patients. *Hypertens Res* 29 (8), S. 581–587.

Karmazyn, M. (1988). Amiloride enhances postischemic ventricular recovery: possible role of Na⁺-H⁺ exchange. *Am. J. Physiol.* 255, H608–H615.

Kavey, N. B.; Blitzler, A.; Gidro-Frank, S.; Korstanje, K. (1985): Sleeping position and sleep apnea syndrome. *Am J Otolaryngol* 6 (5), S. 373–377.

Kelm, M.; Strauer, B. E. (1999): Endotheliale Dysfunktion Therapeutische und prognostische Relevanz. *Internist* 40 (12), S. 1300-1307.

Khan, Shakil A.; Hare, Joshua M. (2003): The role of nitric oxide in the physiological regulation of Ca²⁺ cycling. *Curr Opin Drug Discov Devel* 6 (5), S. 658–666.

Kohler, Malcolm; Stoewhas, Anne-Christin; Ayers, Lisa; Senn, Oliver; Bloch, Konrad E.; Russi, Erich W.; Stradling, John R. (2011): Effects of continuous positive airway pressure therapy withdrawal in patients with obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 184 (10), S. 1192–1199.

Kokturk, Oguz; Ciftci, Tansu Ulukavak; Mollarecep, Elif; Ciftci, Bulent (2005): Elevated C-reactive protein levels and increased cardiovascular risk in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Int Heart J* 46 (5), S. 801–809.

Kokubo, Yoshihiro; Kamide, Kei; Okamura, Tomonori; Watanabe, Makoto; Higashiyama, Aya; Kawanishi, Katsuyuki et al. (2008): Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease in a Japanese urban cohort: the Suita study. *Hypertension* 52 (4), S. 652–659.

Kraiczi, H.; Peker, Y.; Caidahl, K.; Samuelsson, A.; Hedner, J. (2001): Blood pressure, cardiac structure and severity of obstructive sleep apnea in a sleep clinic population. *J Hypertens* 19 (11), S. 2071–2078.

Kratsios, Paschalis; Catela, Catarina; Salimova, Ekaterina; Huth, Marion; Berno, Valeria; Rosenthal, Nadia; Mourkioti, Foteini (2010): Distinct roles for cell-autonomous Notch

signaling in cardiomyocytes of the embryonic and adult heart. *Circ Res* 106 (3), S. 559–572.

Kraut, Simone (2014): Pathomechanismen der Schlafapnoe im Mausmodell Rolle der endothelialen und induzierbaren NO-Synthase. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen.

Kukielka, G. L.; Smith, C. W.; Manning, A. M.; Youker, K. A.; Michael, L. H.; Entman, M. L. (1995): Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. *Circulation* 92 (7), S. 1866–1875.

Kusumoto, K., Haist, J. V., and Karmazyn, M. (2001). Na(+)/H(+) exchange inhibition reduces hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H738–H745.

Labrousse AM, Zappaterra MD, Rube DA und van der Bliek AM (1999) C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol.Cell* 4, 815-826.

Lang, Gudrun (2013): Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. 2., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Vienna: Springer (SpringerLink : Bücher).

Lavie L. (2003) Obstructive sleep apnoea syndrome as an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev* 35-51.

Lavie L. (2015): Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia - Revisited - The bad ugly and good: Implications to the heart and brain, *Sleep Medicine Reviews*, 27-45.

Lebrun, P.; Cognard, E.; Bellon-Paul, R.; Gontard, P.; Filloux, C.; Jehl-Pietri, C. et al. (2009): Constitutive expression of suppressor of cytokine signalling-3 in skeletal muscle leads to reduced mobility and overweight in mice. *Diabetologia* 52 (10), S. 2201–2212.

Lee, Euhun J.; Woodske, Matthew E.; Zou, Baobo; O'Donnell, Christopher P. (2009): Dynamic arterial blood gas analysis in conscious, unrestrained C57BL/6J mice during exposure to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 107 (1), S. 290–294.

Liang, Xiao; He, Ming; Chen, Tao; Liu, Yan; Tian, Yu-Ling; Wu, Yu-Liang et al. (2013): Multiple roles of SOCS proteins: differential expression of SOCS1 and SOCS3 in atherosclerosis. *Int J Mol Med* 31 (5), S. 1066–1074.

Lindner, Volkhard; Booth, Christina; Prudovsky, Igor; Small, Deena; Maciag, Thomas; Liaw, Lucy (2001): Members of the Jagged/Notch Gene Families Are Expressed in Injured

- Arteries and Regulate Cell Phenotype via Alterations in Cell Matrix and Cell-Cell Interaction. *The American Journal of Pathology* 159 (3), S. 875–883.
- Liu, Ren; Trindade, Alexandre; Sun, Zhanfeng; Kumar, Ram; Weaver, Fred A.; Krasnoperov, Valery et al. (2012): Inhibition of Notch signaling by DLL4-Fc promotes reperfusion of acutely ischemic tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 418 (1), S. 173–179.
- Lorier, Gabriel; Touriño, Cristina; Kalil, Renato A. K. (2011): Angiogênese coronariana como resposta endógena da isquemia miocárdica no adulto. *Arq. Bras. Cardiol.* 97 (6), S. e140-e148.
- Lugliani, R.; Whipp, B. J.; Seard, C.; Wasserman, K. (1971): Effect of bilateral carotid-body resection on ventilatory control at rest and during exercise in man. *N Engl J Med* 285 (20), S. 1105–1111.
- Ma, Jiangwei; Qiao, Zengyong; Xu, Biao (2013): Effects of ischemic preconditioning on myocardium Caspase-3, SOCS-1, SOCS-3, TNF- α and IL-6 mRNA expression levels in myocardium IR rats. *Mol. Biol. Rep.* 40 (10), S. 5741–5748.
- Maeder, Micha T.; Strobel, Werner; Christ, Michael; Todd, John; Estis, Joel; Wildi, Karin et al. (2014): Comprehensive biomarker profiling in patients with obstructive sleep apnea. *Clin Biochem.*
- Manning, Gerard (2005): Genomic overview of protein kinases. *WormBook*, S. 1–19.
- Marney, Annis M.; Brown, Nancy J. (2007): Aldosterone and end-organ damage. *Clin Sci (Lond)* 113 (6), S. 267–278.
- Maser, Raelene E.; Lenhard, M. James; Rizzo, Albert A.; Vasile, Anthony A. (2008): Continuous positive airway pressure therapy improves cardiovascular autonomic function for persons with sleep-disordered breathing. *Chest* 133 (1), S. 86–91.
- Matsui, Yoshio; Eguchi, Kazuo; Shibasaki, Seiichi; Shimizu, Motohiro; Ishikawa, Joji; Shimada, Kazuyuki; Kario, Kazuomi (2009): Association between the morning-evening difference in home blood pressure and cardiac damage in untreated hypertensive patients. *J Hypertens* 27 (4), S. 712–720.
- Maurer, J. T.; Stuck, B. A.; Hein, G.; Verse, T.; Hormann, K. (2003): Treatment of obstructive sleep apnea with a new vest preventing the supine position. *Dtsch Med Wochenschr* 128 (3), S. 71–75.

- Messerschmitt M, Jakobs S, Vogel F, Fritz S, Dimmer KS, Neupert W und Westermann B (2003) The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* 160, 553-564.
- Meuer K, Suppanz IE, Lingor P, Planchamp V, Gorické B, Fichtner L, Braus GH, Dietz GP, Jakobs S, Bahr M und Weishaupt JH (2007) Cyclin-dependent kinase 5 is an upstream regulator of mitochondrial fission during neuronal apoptosis. *Cell Death. Differ.* 1-11.
- Miele, L.; Osborne, B. (1999): Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J Cell Physiol* 181 (3), S. 393–409.
- Milling, Andrea (2013): Kardiale Rotation, Torsion und circumferentielle Strain in der Diagnostik der Dilatativen Kardiomyopathie des Dobermanns.
- Minemura, H.; Akashiba, T.; Yamamoto, H.; Akahoshi, T.; Kosaka, N.; Horie, T. (1998): Acute effects of nasal continuous positive airway pressure on 24-hour blood pressure and catecholamines in patients with obstructive sleep apnea. *Intern Med* 37 (12), S. 1009–1013.
- Minoguchi, Kenji; Tazaki, Toshiyuki; Yokoe, Takuya; Minoguchi, Hideko; Watanabe, Yoshio; Yamamoto, Mayumi; Adachi, Mitsuru (2004): Elevated production of tumor necrosis factor- α by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 126 (5), S. 1473–1479.
- Miyamoto T, Kitamura N, Ono M, Nakamura Y, Yoshida M, Kamino H, Murai R, Yamada T, Arakawa H (2012) Identification of 14-3-3 γ as a MitoAIP-interacting protein and its role in mitochondrial quality control. *Scientific reports* 2:379
- Mohamed, Tamer M A; Ozeandiy, Delvac; Zi, Min; Prehar, Sukhpal; Alatwi, Nasser; Wang, Yanwen et al. (2011): Plasma membrane calcium pump (PMCA4)-neuronal nitric-oxide synthase complex regulates cardiac contractility through modulation of a compartmentalized cyclic nucleotide microdomain. *J Biol Chem* 286 (48), S. 41520–41529.
- Molkentin, Jeffery D.; Lu, Jian-Rong; Antos, Christopher L.; Markham, Bruce; Richardson, James; Robbins, Jeffrey et al. (1998): A Calcineurin-Dependent Transcriptional Pathway for Cardiac Hypertrophy. *Cell* 93 (2), S. 215–228.

- Moore, T.; Franklin, K. A.; Holmstrom, K.; Rabben, T.; Wiklund, U. (2001): Sleep-disordered breathing and coronary artery disease: long-term prognosis. *Am J Respir Crit Care Med* 164 (10 Pt 1), S. 1910–1913.
- Moore-Gillon, J. C.; Cameron, I. R. (1985): Right ventricular hypertrophy and polycythaemia in rats after intermittent exposure to hypoxia. *Clin Sci (Lond)* 69 (5), S. 595–599.
- Motz, W.; Scheler, S.; Schwartzkopff, B.; Strauer, B. E. (1995): Evaluation of cardiac damage in hypertension. *J Cardiovasc Risk* 2 (1), S. 16–26.
- Mozdy AD, McCaffery JM und Shaw JM (2000) Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J.Cell Biol.* 151, 367-380.
- Nakatani, Satoshi (2011): Left ventricular rotation and twist: why should we learn? *J Cardiovasc Ultrasound* 19 (1), S. 1–6.
- Nemir, Mohamed; Metrich, Mélanie; Plaisance, Isabelle; Lepore, Mario; Cruchet, Steeve; Berthonneche, Corinne et al. (2014): The Notch pathway controls fibrotic and regenerative repair in the adult heart. *Eur. Heart J.* 35 (32), S. 2174–2185.
- Nieto, F. J.; Young, T. B.; Lind, B. K.; Shahar, E.; Samet, J. M.; Redline, S. et al. (2000): Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *JAMA* 283 (14), S. 1829–1836.
- Noda, Akiko (1995): Cardiac Hypertrophy in Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *CHEST* 107 (6), S. 1538.
- Oba, Toyoharu; Yasukawa, Hideo; Hoshijima, Masahiko; Sasaki, Ken-ichiro; Futamata, Nobuyoshi; Fukui, Daisuke et al. (2012): Cardiac-specific deletion of SOCS-3 prevents development of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 59 (9), S. 838–852.
- Oceandy, D.; Mohamed, Tamer M. A.; Prehar, S.; Zi, M.; Stanley, P.; Baudoin, F. et al. (2008): The Sarcolemmal Calcium Pump 4 (PMCA4) is a Powerful Regulator of Pathological Hypertrophy via the Nitric Oxide- Foxo3a Pathway. *Circulation* (118), S. 422–423.
- Oceandy, Delvac; Cartwright, Elizabeth J.; Emerson, Michael; Prehar, Sukhpal; Baudoin, Florence M.; Zi, Min et al. (2007): Neuronal nitric oxide synthase signaling in the heart is regulated by the sarcolemmal calcium pump 4b. *Circulation* 115 (4), S. 483–492.

Ohayon, M. M.; Guilleminault, C.; Priest, R. G.; Caulet, M. (1997): Snoring and breathing pauses during sleep: telephone interview survey of a United Kingdom population sample. *BMJ* 314 (7084), S. 860–863.

Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P und Lenaers G (2003) Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J.Biol.Chem.* 278, 7743-7746.

Ono T, Isobe K, Nakada K und Hayashi JI (2001) Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat.Genet.* 28, 272- 275.

Ozasa, Yukako; Akazawa, Hiroshi; Qin, Yingjie; Tateno, Kaoru; Ito, Kaoru; Kudo-Sakamoto, Yoko et al. (2013): Notch activation mediates angiotensin II-induced vascular remodeling by promoting the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 36 (10), S. 859–865.

Pack, Allan I.; Gislason, Thorarinn (2009): Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease: a perspective and future directions. *Prog Cardiovasc Dis* 51 (5), S. 434–451.

Pamidi, Sushmita; Aronsohn, Renee S.; Tasali, Esra (2010): Obstructive Sleep Apnea: Role in the Risk and Severity of Diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24 (5), S. 703–715.

Pamidi, Sushmita; Wroblewski, Kristen; Stepien, Magdalena; Sharif-Sidi, Khalid; Kilkus, Jennifer; Whitmore, Harry; Tasali, Esra (2015): Eight Hours of Nightly Continuous Positive Airway Pressure Treatment of Obstructive Sleep Apnea Improves Glucose Metabolism in Patients with Prediabetes. A Randomized Controlled Trial. *Am J Respir Crit Care Med* 192 (1), S. 96–105.

Park, A.-M.; Nagase, H.; Kumar, S.V.; Suzuki, Y.J. (2007): Forum Review: Effects of Intermittent Hypoxia on the Heart, *Antioxidants & Redox Signaling Vol. 9, 6*

Patel, Sanjay R.; Zhu, Xiaobei; Storfer-Isser, Amy; Mehra, Reena; Jenny, Nancy S.; Tracy, Russell; Redline, Susan (2009): Sleep duration and biomarkers of inflammation. *Sleep* 32 (2), S. 200–204.

Patil, Susheel P.; Schneider, Hartmut; Schwartz, Alan R.; Smith, Philip L. (2007): Adult Obstructive Sleep Apnea*: Pathophysiology and Diagnosis. *Chest* 132 (1), S. 325. DOI: 10.1378/chest.07-0040.

- Peker, Y.; Carlson, J.; Hedner, J. (2006): Increased incidence of coronary artery disease in sleep apnoea: a long-term follow-up. *Eur Respir J* 28 (3), S. 596–602.
- Peker, Y.; Hedner, J.; Kraiczi, H.; Loth, S. (2000): Respiratory disturbance index: an independent predictor of mortality in coronary artery disease. *Am J Respir Crit Care Med* 162 (1), S. 81–86.
- Pelletier-Fleury, N.; Rakotonanahary, D.; Fleury, B. (2001): The age and other factors in the evaluation of compliance with nasal continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnea syndrome. A Cox's proportional hazard analysis. *Sleep Med* 2 (3), S. 225–232.
- Pelloquin L, Belenguer P, Menon Y und Ducommun B (1998) Identification of a fission yeast dynamin-related protein involved in mitochondrial DNA maintenance. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 251, 720-726.
- Peppard, P. E.; Young, T.; Palta, M.; Dempsey, J.; Skatrud, J. (2000a): Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *JAMA* 284 (23), S. 3015–3021.
- Peppard, P. E.; Young, T.; Palta, M.; Skatrud, J. (2000b): Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med* 342 (19), S. 1378–1384.
- Picard, Martin; Gentil, Benoit J.; McManus, Meagan J.; White, Kathryn; St Louis, Kyle; Gartside, Sarah E. et al. (2013): Acute exercise remodels mitochondrial membrane interactions in mouse skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 115 (10), S. 1562–1571.
- Plywaczewski, Robert; Bednarek, Michal; Jonczak, Luiza; Zielinski, Jan (2008): Sleep-disordered breathing in a middle-aged and older Polish urban population. *J Sleep Res* 17 (1), S. 73–81.
- Poza, J. J.; Martinez, A.; Emparanza, J. I.; Lopez de Munain, A; Marti Masso, J F (2000): Sleep apnea syndrome and cerebral infarction. *Neurologia* 15 (1), S. 3–7.
- Prabhat, K. C.; Goyal, Lata; Bey, Afshan; Maheshwari, Sandhya (2012): Recent advances in the management of obstructive sleep apnea: The dental perspective. *J Nat Sci Biol Med* 3 (2), S. 113–117.
- Pratt-Ubunama, Monique N.; Nishizaka, Mari K.; Boedefeld, Robyn L.; Cofield, Stacey S.; Harding, Susan M.; Calhoun, David A. (2007): Plasma aldosterone is related to severity of

obstructive sleep apnea in subjects with resistant hypertension. *Chest* 131 (2), S. 453–459.

Punjabi, Naresh M. (2008): The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc* 5 (2), S. 136–143.

Punjabi, Naresh M.; Sorkin, John D.; Katzel, Leslie I.; Goldberg, Andrew P.; Schwartz, Alan R.; Smith, Philip L. (2002): Sleep-disordered breathing and insulin resistance in middle-aged and overweight men. *Am J Respir Crit Care Med* 165 (5), S. 677–682.

Qi Z, He J, Su Y, He Q, Liu J, Yu L, Al-Attas O, Hussain T, Ding S, Ji L, Qian M (2011) Physical exercise regulates p53 activity targeting SCO2 and increases mitochondrial COX biogenesis in cardiac muscle with age. *PLoS One* 6:e21140

Quillard, T.; Coupel, S.; Coulon, F.; Fitau, J.; Chatelais, M.; Cuturi, M. C. et al. (2008): Impaired Notch4 activity elicits endothelial cell activation and apoptosis: implication for transplant arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (12), S. 2258–2265.

Quillard, Thibaut; Devallière, Julie; Coupel, Stéphanie; Charreau, Béatrice (2010): Inflammation dysregulates Notch signaling in endothelial cells: implication of Notch2 and Notch4 to endothelial dysfunction. *Biochem. Pharmacol.* 80 (12), S. 2032–2041.

Regensteiner, J. G.; McCullough, R. G.; McCullough, R. E.; Pickett, C. K.; Moore, L. G. (1990): Combined effects of female hormones and exercise on hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol* 82 (1), S. 107–114.

Reichmuth, Kevin J.; Austin, Diane; Skatrud, James B.; Young, Terry (2005): Association of sleep apnea and type II diabetes: a population-based study. *Am J Respir Crit Care Med* 172 (12), S. 1590–1595.

Reinhart, W. H.; Oswald, J.; Walter, R.; Kuhn, M. (2002): Blood viscosity and platelet function in patients with obstructive sleep apnea syndrome treated with nasal continuous positive airway pressure. *Clin Hemorheol Microcirc* 27 (3-4), S. 201–207.

Rius, Jordi; Guma, Monica; Schachtrup, Christian; Akassoglou, Katerina; Zinkernagel, Annelies S.; Nizet, Victor et al. (2008): NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 453 (7196), S. 807–811.

Rizzo, Paola; Mele, Donato; Caliceti, Cristiana; Pannella, Micaela; Fortini, Cinzia; Clementz, Anthony George et al. (2014): The role of notch in the cardiovascular system: potential adverse effects of investigational notch inhibitors. *Front Oncol* 4, S. 384.

- Rolfe, D. F.; Brown, G. C. (1997): Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77 (3), S. 731–758.
- Ronksley, P. E.; Hemmelgarn, B. R.; Heitman, S. J.; Hanly, P. J.; Faris, P. D.; Quan, H.; Tsai, W. H. (2009): Obstructive sleep apnoea is associated with diabetes in sleepy subjects. *Thorax* 64 (10), S. 834–839.
- Ross, R. (1999): Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340 (2), S. 115–126.
- Rutka JT, Giblin JR, Berens ME, Bar-Shiva E, Tokuda K, McCulloch JR, Rosenblum ML, Eessalu TE, Aggarwal BB and Bodell WJ. (1988). *Int. J. Cancer*, 41, 573 ± 582.
- Ryan, Silke (2013): The effect of continuous positive airway pressure therapy on vascular function in obstructive sleep apnea: how much is enough? *Sleep Med* 14 (12), S. 1231–1232.
- Ryan, Silke; Taylor, Cormac T.; McNicholas, Walter T. (2005): Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 112 (17), S. 2660–2667.
- Sankri-Tarbichi, Abdul Ghani (2012): Obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome: Etiology and diagnosis. *Avicenna journal of medicine* 2 (1), S. 3–8.
- Schmieder, R. E.; Messerli, F. H. (2000): Hypertension and the heart. *J Hum Hypertens* 14 (10-11), S. 597–604.
- Schofield, Christopher J.; Ratcliffe, Peter J. (2004): Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (5), S. 343–354.
- Schroeder, Andreas; Mueller, Odilo; Stocker, Susanne; Salowsky, Ruediger; Leiber, Michael; Gassmann, Marcus et al. (2006): The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology* 7, S. 3.
- Schulz, Richard; Hummel, Christoph; Heinemann, Sabine; Seeger, Werner; Grimminger, Friedrich (2002): Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 165 (1), S. 67–70.
- Schwab, J.; Schneider, M. P.; Pauschinger, M.; Schmieder, R. E. (2009): Hypertension and diastolic dysfunction. *MMW Fortschr Med* 151 (23), S. 41–43.

- Sears, Claire E.; Bryant, Simon M.; Ashley, Euan A.; Lygate, Craig A.; Rakovic, Stevan; Wallis, Helen L. et al. (2003): Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling. *Circ Res* 92 (5), S. e52-9.
- Seicean, Sinziana; Kirchner, H. Lester; Gottlieb, Daniel J.; Punjabi, Naresh M.; Resnick, Helaine; Sanders, Mark et al. (2008): Sleep-disordered breathing and impaired glucose metabolism in normal-weight and overweight/obese individuals: the Sleep Heart Health Study. *Diabetes Care* 31 (5), S. 1001–1006.
- Sesaki H und Jensen RE (1999) Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J.Cell Biol.* 147, 699-706.
- Shahar, E.; Whitney, C. W.; Redline, S.; Lee, E. T.; Newman, A. B.; Nieto, F. J. et al. (2001): Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 163 (1), S. 19–25.
- Shepard, J W Jr; Garrison, M. W.; Grither, D. A.; Dolan, G. F. (1985): Relationship of ventricular ectopy to oxyhemoglobin desaturation in patients with obstructive sleep apnea. *Chest* 88 (3), S. 335–340.
- Shepertycky, Marha R.; Banno, Katsuhisa; Kryger, Meir H. (2005): Differences between men and women in the clinical presentation of patients diagnosed with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep* 28 (3), S. 309–314.
- Shitrit, David; Peled, Nir; Shitrit, Ariella Bar-Gil; Meidan, Silvia; Bendayan, Daniel; Sahar, Gidon; Kramer, Mordechai R. (2005): An association between oxygen desaturation and D-dimer in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Thromb Haemost* 94 (3), S. 544–547.
- Silbernagl, Stefan; Despopoulos, Agamemnon (2012): Taschenatlas Physiologie. 8., überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Sin, D. D.; Fitzgerald, F.; Parker, J. D.; Newton, G.; Floras, J. S.; Bradley, T. D. (1999): Risk factors for central and obstructive sleep apnea in 450 men and women with congestive heart failure. *Am J Respir Crit Care Med* 160 (4), S. 1101–1106.
- Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN und van der Bliek AM (1998) A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J.Cell Biol.* 143, 351-358.
- Smith, I.; Lasserson, T. J.; Wright, J. (2006): Drug therapy for obstructive sleep apnoea in adults. *Cochrane Database Syst Rev* (2), S. CD003002.

Smith, Robert; Ronald, John; Delaive, Kenneth; Walld, Randy; Manfreda, Jure; Kryger, Meir H. (2002): What are obstructive sleep apnea patients being treated for prior to this diagnosis? *Chest* 121 (1), S. 164–172.

Somers, V. K.; Dyken, M. E.; Clary, M. P.; Abboud, F. M. (1995): Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest* 96 (4), S. 1897–1904.

Somers, Virend K.; White, David P.; Amin, Raouf; Abraham, William T.; Costa, Fernando; Culebras, Antonio et al. (2008a): Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College Of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health). *Circulation* 118 (10), S. 1080–1111.

Somers, Virend K.; White, David P.; Amin, Raouf; Abraham, William T.; Costa, Fernando; Culebras, Antonio et al. (2008b): Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College Of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health). *Circulation* 118 (10), S. 1080–1111.

Steinopoulos, Paschalis; Kotsianidis, Ioannis; Nena, Evangelia; Tsara, Venetia; Gounari, Evdokia; Hatzizisi, Olga et al. (2009): Long-term effect of continuous positive airway pressure therapy on inflammation markers of patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep* 32 (4), S. 537–543.

Strehler, E.E.; Zacharias, D.A. (2001): Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol. Rev.* 81(1): 21-50.

Sutton, M. G. St. J.; Sharpe, N. (2000): Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. Pathophysiology and Therapy. *Circulation* 101 (25), S. 2981–2988.

Sweeney, Catherine; Morrow, David; Birney, Yvonne A.; Coyle, Seamus; Hennessy, Colm; Scheller, Agnieszka et al. (2004): Notch 1 and 3 receptor signaling modulates vascular smooth muscle cell growth, apoptosis, and migration via a CBF-1/RBP-Jk dependent pathway. *FASEB J* 18 (12), S. 1421–1423.

- Tagaito, Y.; Polotsky, V. Y.; Campen, M. J.; Wilson, J. A.; Balbir, A.; Smith, P. L. et al. (2001): A model of sleep-disordered breathing in the C57BL/6J mouse. *J Appl Physiol* (1985) 91 (6), S. 2758–2766.
- Takahashi, Susumu; Nakamura, Yutaka; Nishijima, Tsuguo; Sakurai, Shigeru; Inoue, Hiroshi (2005): Essential roles of angiotensin II in vascular endothelial growth factor expression in sleep apnea syndrome. *Respir Med* 99 (9), S. 1125–1131.
- Takeshita, Kyosuke; Satoh, Minoru; Ii, Masaaki; Silver, Marcy; Limbourg, Florian P.; Mukai, Yasushi et al. (2007): Critical role of endothelial Notch1 signaling in postnatal angiogenesis. *Circ Res* 100 (1), S. 70–78.
- Tamisier, R.; Pépin, J. L.; Rémy, J.; Baguet, J. P.; Taylor, J. A.; Weiss, J. W.; Lévy, P. (2011): 14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans. *Eur Respir J* 37 (1), S. 119–128.
- Teckman, Jeffrey H.; An, Jae-Koo; Blomenkamp, Keith; Schmidt, Bela; Perlmutter, David (2004): Mitochondrial autophagy and injury in the liver in alpha 1-antitrypsin deficiency. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 286 (5), S. G851-62.
- Tei, C.; Dujardin, K. S.; Hodge, D. O.; Kyle, R. A.; Tajik, A. J.; Seward, S. B. (1996): Doppler index combining systolic and diastolic myocardial performance: clinical value in cardiac amyloidosis. *J Am Coll Cardiol* (3), S. 658–664.
- Teramoto, Shinji; Kume, Haruki; Yamamoto, Hiroshi; Ishii, Takeo; Miyashita, Akira; Matsuse, Takeshi et al. (2003): Effects of oxygen administration on the circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Intern Med* 42 (8), S. 681–685.
- Teran-Santos, J.; Jimenez-Gomez, A.; Cordero-Guevara, J. (1999): The association between sleep apnea and the risk of traffic accidents. Cooperative Group Burgos-Santander. *N Engl J Med* 340 (11), S. 847–851.
- Teshima, Y., Akao, M., Jones, S. P., and Marban, E. (2003). Cariporide (HOE642), a selective Na⁺-H⁺ exchange inhibitor, inhibits the mitochondrial death pathway. *Circulation* 108, 2275–2281.
- Tieu Q, Okreglak V, Naylor K und Nunnari J (2002) The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J. Cell Biol.* 158, 445-452.

- Tishler, Peter V.; Larkin, Emma K.; Schluchter, Mark D.; Redline, Susan (2003): Incidence of sleep-disordered breathing in an urban adult population: the relative importance of risk factors in the development of sleep-disordered breathing. *JAMA* 289 (17), S. 2230–2237.
- Trindade, Alexandre; Djokovic, Dusan; Gigante, Joana; Badenes, Marina; Pedrosa, Ana-Rita; Fernandes, Ana-Carina et al. (2012): Low-dosage inhibition of Dll4 signaling promotes wound healing by inducing functional neo-angiogenesis. *PLoS One* 7 (1), S. e29863.
- Tsatsanis, Christos; Androulidaki, Ariadne; Venihaki, Maria; Margioris, Andrew N. (2006): Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol* 38 (10), S. 1654–1661.
- Urbanek, Konrad; Cabral-da-Silva, Mauricio Castro; Ide-Iwata, Noriko; Maestroni, Silvia; Delucchi, Francesca; Zheng, Hanqiao et al. (2010): Inhibition of notch1-dependent cardiomyogenesis leads to a dilated myopathy in the neonatal heart. *Circ Res* 107 (3), S. 429–441.
- Vaddi, K.; Nicolini, F. A.; Mehta, P.; Mehta, J. L. (1994): Increased secretion of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by mononuclear leukocytes in patients with ischemic heart disease. Relevance in superoxide anion generation. *Circulation* 90 (2), S. 694–699.
- van Uden, Patrick; Kenneth, Niall S.; Rocha, Sonia (2008): Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. In: *Biochem. J.* 412 (3), S. 477–484.
- Verdecchia, P.; Schillaci, G.; Guerrieri, M.; Gatteschi, C.; Benemio, G.; Boldrini, F.; Porcellati, C. (1990): Circadian blood pressure changes and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Circulation* 81 (2), S. 528–536.
- Villa-Abrille, M. C., Cingolani, E., Cingolani, H. E., and Alvarez, B. V. (2011). Silencing of cardiac mitochondrial NHE1 prevents mitochondrial permeability transition pore opening. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H1237–H1251.
- Vitarelli, Antonio; D'Orazio, Simona; Caranci, Fiorella; Capotosto, Lidia; Rucos, Raymond; Iannucci, Gino et al. (2013): Left ventricular torsion abnormalities in patients with obstructive sleep apnea syndrome: an early sign of subclinical dysfunction. *Int J Cardiol* 165 (3), S. 512–518.

- Wahlin-Larsson, Britta; Ulfberg, Jan; Aulin, Karin Piehl; Kadi, Fawzi (2009): The expression of vascular endothelial growth factor in skeletal muscle of patients with sleep disorders. *Muscle Nerve* 40 (4), S. 556–561.
- Walshe, Tony E.; Connell, Paul; Cryan, Lorna; Ferguson, Gail; Gardiner, Tom; Morrow, David et al. (2011): Microvascular retinal endothelial and pericyte cell apoptosis in vitro: role of hedgehog and Notch signaling. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52 (7), S. 4472–4483.
- Waltenberger, J.; Mayr, U.; Pentz, S.; Hombach, V. (1996): Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation* 94 (7), S. 1647–1654.
- Wang G.L., Semenza G.L. (1993): General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 90: 4304-4308.
- Wang, J.; Shelly, L.; Miele, L.; Boykins, R.; Norcross, M. A.; Guan, E. (2001): Human Notch-1 inhibits NF-kappa B activity in the nucleus through a direct interaction involving a novel domain. *J Immunol* 167 (1), S. 289–295.
- Wang, Y., Meyer, J. W., Ashraf, M., and Shull, G. E. (2003). Mice with a null mutation in the NHE1 Na⁺-H⁺ exchanger are resistant to cardiac ischemia-reperfusion injury. *Circ. Res.* 93, 776–782.
- Wang, Zhang; Si, Liang-yi (2013): Hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in the cardioprotective effects of intermittent hypoxia in rats. *Ups. J. Med. Sci.* 118 (2), S. 65–74.
- Wang, Zhenyu; Nicolas, Claire; Fischmeister, Rodolphe; Brenner, Catherine (2015): Enzymatic assays for probing mitochondrial apoptosis. *Methods Mol. Biol.* 1265, S. 407–414.
- Watkins P.C.; Eddy R.; Hoffman N.; Stanislovitis P.; Beck A.K.; Galli J.; Vellucci V.; Gusella J.F.; Shows T.B. (1986): Regional assignment of the erythropoietin gene to human chromosome region 7pter----q22. *Cytogene Cell Genet* 42: 214-218
- Watson, Oliver; Novodvorsky, Peter; Gray, Caroline; Rothman, Alexander M K; Lawrie, Allan; Crossman, David C. et al. (2013): Blood flow suppresses vascular Notch signalling via dll4 and is required for angiogenesis in response to hypoxic signalling. *Cardiovasc Res* 100 (2), S. 252–261.

- Welsch, Ulrich; Sobotta, Johannes (2006): Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen. 2., völlig überarb. Aufl. München, Jena: Elsevier, Urban und Fischer.
- Wenzel, S.; Smith, E.; Leiacker, R.; Fischer, Y. (2007): Effektivität und Langzeit-Compliance der Therapie mit Rückenlage-Verhinderungsweste bei obstruktiver Schlafapnoe. *Laryngorhinootologie* 86 (8), S. 579–583.
- West, S. D.; Nicoll, D. J.; Stradling, J. R. (2006): Prevalence of obstructive sleep apnoea in men with type 2 diabetes. *Thorax* 61 (11), S. 945–950.
- Whittle, A. T.; Marshall, I.; Mortimore, I. L.; Wraith, P. K.; Sellar, R. J.; Douglas, N. J. (1999): Neck soft tissue and fat distribution: comparison between normal men and women by magnetic resonance imaging. *Thorax* 54 (4), S. 323–328.
- Woods, D.; Stacey, M.; Hill, N.; Alwis, N. d. (2011): Endocrine Aspects of High Altitude Acclimatization and Acute Mountain Sickness. *Journal of the Royal Army Medical Corps* 157 (1), S. 33–37.
- Wu, Xiaojing; Zou, Yunzeng; Zhou, Qi; Huang, Lan; Gong, Hui; Sun, Aijun et al. (2011): Role of Jagged1 in arterial lesions after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31 (9), S. 2000–2006.
- Wu, Xu; Chang, Baojun; Blair, N. Scott; Sargent, Michelle; York, Allen J.; Robbins, Jeffrey et al. (2009): Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 4 antagonizes cardiac hypertrophy in association with calcineurin inhibition in rodents. *J Clin Invest* 119 (4), S. 976–985.
- Yasukawa, Hideo; Nagata, Takanobu; Oba, Toyoharu; Imaizumi, Tsutomu (2012): SOCS3: A novel therapeutic target for cardioprotection. *JAKSTAT* 1 (4), S. 234–240.
- Young, T.; Hutton, R.; Finn, L.; Badr, S.; Palta, M. (1996): The gender bias in sleep apnea diagnosis. Are women missed because they have different symptoms? *Arch Intern Med* 156 (21), S. 2445–2451.
- Young, T.; Palta, M.; Dempsey, J.; Skatrud, J.; Weber, S.; Badr, S. (1993): The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 328 (17), S. 1230–1235.
- Young, T.; Peppard, P.; Palta, M.; Hla, K. M.; Finn, L.; Morgan, B.; Skatrud, J. (1997): Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension. *Arch Intern Med* 157 (15), S. 1746–1752.

- Young, Terry; Peppard, Paul E.; Gottlieb, Daniel J. (2002a): Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 165 (9), S. 1217–1239.
- Young, Terry; Peppard, Paul E.; Gottlieb, Daniel J. (2002b): Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 165 (9), S. 1217–1239.
- Yu, Bentong; Song, Baoquan (2014): Notch 1 signalling inhibits cardiomyocyte apoptosis in ischaemic postconditioning. *Heart Lung Circ* 23 (2), S. 152–158.
- Zamarron, C.; Gude, F.; Otero, Y.; Alvarez, J. M.; Golpe, A.; Rodriguez, J. R. (1999): Prevalence of sleep disordered breathing and sleep apnea in 50- to 70-year-old individuals. A survey. *Respiration* 66 (4), S. 317–322.
- Zamarron, Carlos; Ricoy, Jorge; Riveiro, Alberto; Gude, Francisco (2008): Plasminogen activator inhibitor-1 in obstructive sleep apnea patients with and without hypertension. *Lung* 186 (3), S. 151–156.
- Zamarrón, Carlos; Valdés Cuadrado, Luis; Alvarez-Sala, Rodolfo (2013): Pathophysiologic mechanisms of cardiovascular disease in obstructive sleep apnea syndrome. *Pulm Med* 2013, S. 521087.
- Zamzami, N.; Kroemer, G. (2001): The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (1), S. 67–71.
- Zhang, Fan; Tang, Zhongshu; Hou, Xu; Lennartsson, Johan; Li, Yang; Koch, Alexander W. et al. (2009): VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (15), S. 6152–6157.
- Zoratti, M.; Szabo, I. (1995): The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241 (2), S. 139–176.

11 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer und Lehrerinnen an der Philipps-Universität in Marburg waren die folgenden Damen und Herren:

Adamkiewicz, Bartsch, Baum, Becker, K., Becker, S., Bein, Berger, Bien, Bösner, Czubayko, Daut, Dettmeyer, Eikmann, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Gress, Grosse, Hertl, Heverhagen, Hilt, Hofmann, Hoyer, Jacques, Kinscherf, Kircher, Koolmann, Kruse, Lill, Löffler, Lohoff, Luster, Mahnken, Maier, Moll, Moosdorf, Müller, Neff, Neubauer, Nimsky, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Plant, Preisig-Müller, Renz, Richter, Roehm, Ruchholtz, Sahlmand, Schieffer, Schneider, Sekundo, Thieme, Tritz, Vogelmeier, Vogt, Werner, Wulf, Zovko

12 Danksagung

Einen besonderen Dank richte ich an Herrn Prof. Dr. Ralf Kinscherf für die Bereitsellung dieses sehr interessanten Dissertationsthemas sowie die Begleitung und Beachtung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Wulf Hildebrandt und Herrn Dr. Gabriel Bonaterra für ihre sehr gute Betreuung und ihr allzeit „offenes Ohr“ für Sorgen und Probleme, für welche stets unmittelbar Lösungen gesucht und gefunden wurden.

Ebenfalls gilt ein großer Dank den Mitarbeitern in der Arbeitsgruppe Kinscherf. Namentlich seien hier Frau Prof. Dr. Beate Wilhelm, Michael Dreher, Andrea Cordes, Claudia Keppler, Anne Henkeler, Irmgard Dammhäuser, Elke Völk-Badouin und Hans Schwarzbach für die theoretische und praktische Unterstützung genannt. Für ihre tierexperimentellen Arbeiten im Labor und das Überlassen der Myokardproben soll auch der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Norbert Weissmann und Frau Dr. Simone Kraut an dieser Stelle gedankt werden, denn diese waren Grundlage dieser Arbeit.

Abschließend spreche ich meiner Familie und meinem Freund meinen herzlichsten Dank aus. Sie standen mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite und gaben mir dadurch die Möglichkeit, mich auf die Arbeit an der Dissertation zu konzentrieren. Ohne sie wäre die Bewältigung der vielen Stunden, die für die vorliegende Arbeit aufzubringen waren, nicht möglich gewesen.

Außerdem danke ich Annalena Frewer für ihre stetige Unterstützung, ihren anspornenden Zuspruch und die gemeinsame Zusammenarbeit im Labor.